

PTO 02 4395

German Patent No. 42 44 418 A 1
(Offenlegungsschrift)

PEPTIDE PREPARATION AND METHODS FOR THEIR MANUFACTURE

Gerhard Quelle

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
WASHINGTON, D.C. AUGUST 2002
TRANSLATED BY THE RALPH MCELROY TRANSLATION COMPANY

FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY
GERMAN PATENT OFFICE
PATENT NO. 42 44 418 A 1
(Offenlegungsschrift)

Int. Cl. ⁵ :	A 61 K 7/48 A 61 K 37/02
Filing No.:	P 42 44 418.7
Filing Date:	March 30, 1992
Publication Date:	July 1, 1993
Priority	
Date:	December 30, 1991
Country:	DE
No.:	41 43 178.2

PEPTIDE PREPARATION AND METHODS FOR THEIR MANUFACTURE

Inventor:	Gerhard Quelle 6948 Wald-Michelbach, DE
Applicant:	Same as inventor

Description

/2*

The invention relates to the preparation of peptides and to methods for their manufacture. In the search for effective components from animal tissues for application in medicine, biotechnology and cosmetics, a large number of substances and substance mixtures have been extracted in recent decades, completely or partially characterized, and successfully used. Only a few representative substances are mentioned, such as the epidermal growth factor, collagen type I and type III and hyaluronic acid (British Medical Bulletin, Vol. 45, No. 2, 1989, "Growth Factors," eds. M. D. Waterfield, Churchill Livingstone, Edinburgh; Collagen in Health and Disease, eds. J. B. Weiss and M. I. V. Jayson, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1982; Methods in Enzymology, Vol. 82, 1982, "Structural and Contractile Proteins, part D," ed. L. W. Cunningham, Academic Press, Inc., Orlando).

Many of the active ingredients found to date are very complex molecules, such as proteins, polypeptides or mucopolysaccharides, which are synthesized by the tissue cells from

* [Editor's note: numbers in the right margin indicate represent pagination in the original text.]

small building blocks. The goal of the efforts to date substantially consisted of the extraction, optionally with subsequent chemical-physical modification, of these complex molecules for the purpose of then using them in an advantageous manner.

As a result of enzymatic or chemical-physical degradation, these macromolecules, however, generally lose their effect, they undergo reductions or modifications of their action. For example, when collagen is degraded to gelatin, the water binding capacity, which is important for cosmetics, is decreased (Parfümerie und Kosmetik 65 (7), 1984, 391-401, Alexander Burg: "Use of Proteins in Cosmetics;" RAK – Riechstoffe, Aromen, Kosmetika (7), 1977, R. Riemachneider, W. H. Chik: "On the Water Binding Capacity of Soluble Collagens"). During the further degradation of gelatin to gelatin hydrolysates, peptides having a molecular weight of 500-30,000 dalton are released, which, in comparison to gelatin, present a better application capacity for hair and therefore they have achieved great importance in the field of hair care.

The object of the present invention is the discovery that partial hydrolysates which were obtained under defined conditions as well as the peptides and the mixtures of amino acids and peptides derived there from, whose amino acid sequences are in agreement with the partial sections of the protein amino acid sequence, possess new properties of action, which go clearly beyond the effect of intact proteins.

Brief reference is made to collagen type I as an example.

Collagens, of which at least 13 different types have been isolated and characterized, primarily function as structural proteins in the connective tissue of multicellular organisms. Specific cells, such as for example, fibroblasts in the dermis, synthesize the needle shaped protein molecules, which are composed of three cable-like polypeptides which are screwed into each other. In collagen type I, two of the three polypeptides have identical amino acid sequences and they are called alpha-1(I)-polypeptides (Figure 4), while the third polypeptide, alpha-2(I), has another amino acid sequence (Figure 5). Each polypeptide contains approximately 1000 amino acids. The entire protein has a length of approximate 0.3 μm and a diameter of approximately 0.0015 μm .

Because of the film producing properties and the high water uptake capacity, collagen is used in large quantities in cosmetics. The cosmetic effects of collagen have been limited, so far, substantially to the properties which prevent penetration into the skin as a result of both the chemical structure of the collagen and the molecule size.

If, in contrast, a partial hydrolysate of collagen is manufactured under precisely defined conditions (see Manufacture Preparation A) or a mixture of amino acids and peptides is prepared (Manufacture Preparation B), whose amino acid composition approximates that of the collagen amino acid analysis and whose peptides have amino acid sequences which exactly agree with

certain collagen amino acid sequences (Figures 4 and 5), then these preparations present novel positive effect and properties.

These effects are summarized in part in Table 1. The effective preparations are then called Preparation B and GHL peptide (GHL = glycyl-histidyl-lysine = tripeptide fraction A), and they are compared to the properties of native collagen.

Table 1. Comparison of efficacies of native collagen, preparation B and GHL peptide

Wirkung/Eigenschaften ①	② Kollagen	③ Präparat B	④ GHL-Peptid	
Feuchtigkeitsrückhaltevermögen	++	+	—	P
Zellatmungsaktivierend (Stimulierung des Zellstoffwechsels)	—	++	—	P
Pufferkapazität	+	++	—	P
Stimulierung der Kollagensynthese bei Fibroblasten	—	++	++	P
⑤ Förderung der Wundheilung	+	+	+	P
Radikalfängerwirkung	—	++	+	P
Superoxid-Dismutase-Wirkung	—	++	++	P
Immunstimulierende Wirkung	—	+	+	P
Penetrationsvermögen (Epidermis)	—	+	+	P
Gefahr durch Kontamination mit Säugetierviren	++	—	—	N
Denaturierung bei 30—37° C	++	—	—	N

⑥ P — Positive Eigenschaft
N — Negative Eigenschaft

- Key:
- 1 Effect/properties
 - 2 Collagen
 - 3 Preparation B
 - 4 GHL peptide
 - 5 Humidity retention capacity
Cell respiration activating
(stimulation of the cell metabolism)
Buffer capacity
Stimulation of the collagen synthesis of fibroblasts
Promotion of wound healing
Radical scavenger effect
Superoxide dismutase effect
Immunostimulating effect
Penetration capacity (epidermis)
Risk of contamination with mammalian viruses
Denaturing at 30-70°C
 - 6 P = Positive property
N = Negative property

These partial hydrolysates, isolated peptides and preparations from amino acids and peptides are of particular importance.

1. In biotechnology, as an additive for cell culture nutrient solution for serum deficient or defined serum-free cell culture nutrient media (Application Example 1).
2. In medicine, as a wound healing promotion agent (Application Example 2), for immunostimulation and as an effective substance to increase physiological erythropoietin formation, and
3. In cosmetics, for skin care, as an anti-aging factor and radical scavenger complex (Application Examples 3-5).

Principles of the manufacturing methods

1. Synthetic manufacture

The components of the recipe (Tables 2-14: recipe fractions) are appropriately predissolved and mixed. Individual components of the recipe, such as, for example the tripeptide fraction A and the tripeptide fraction B are purified after partial hydrolysis (principles of manufacturing methods 3-5) with the aid of chromatographic methods, isolated, concentrated and then added to the preparation.

2. Semi-synthetic manufacture

Components of the recipe are mixed with substances obtained by genetic engineering and/or with partial hydrolysates (see principles of manufacturing methods 3-5).

3. Partial hydrolysates with diluted hydrochloric acid

Animal skin or animal lung [tissue], collagen, gelatin or elastin, are hydrolyzed as described in Example 2, then filtered, neutralized, and desalted by reverse osmosis, for example. Optionally there is a treatment with 1N NaOH for 1 h at room temperature, followed by neutralization and renewed desalting.

4. Enzymatic partial hydrolysate with collagenase from *Clostridium histolyticum*

This enzyme cleaves the repeating Gly-X-Y-Gly-X-Y-Gly-X-Y-Gly amino acid sequence of collagen between the Y and the glycine (X, Y stand for different amino acids in the collagen amino acid sequence). Animal skin or animal lung, or collagen type 1, is treated in tris-HCl buffer, pH 7.6 in the presence of CaCl₂, for 90 min at 37°C with collagenase, and the solution is then dialyzed for 24 h at +4°C, preserved and subjected to sterile filtration.

5. Partial hydrolysate of skin keratin with pepsin

An epidermis is treated in the citrate HCl buffer, pH 1.5, for 24 h at room temperature with pepsin (ratio of pepsin to substrate, 1:10), dialyzed, stored for 24 h at pH 10.5 at room

temperature, treated for 1 h with 1N NaOH at room temperature, neutralized, desalted and subjected to sterile filtration.

6. Protein sequences obtained by genetic engineering

/4

Appropriate microorganisms are treated, using known techniques, in such a manner that they synthesize modified collagen, elastin and skin keratin molecules, which contain a larger number of effective peptide sequences. These modified proteins increase the yields in the preparation of effective peptide sequences by partial hydrolysis.

7. Natural preparation

The natural preparation corresponds to the descriptions according to Claim 2 and the principles of manufacturing methods 3-5.

Table 2. Examples 1-6 (in each case in g/L preparation)

Aminosäuren ①	② Bereich	CAS-1	CAS-2	CAS-3	CAS-4	CAS-5	CAS-6
L-Alanin	0-80	4,1	5,1	7,0	9,0	20,0	—
L-Arginin HCl	0-80	4,2	5,2	7,5	10,0	—	—
L-Asparaginsäure	0-5	2,8	3,5	4,0	5,0	—	—
L-Cystein	0	—	—	—	—	—	—
L-Glutaminsäure	0-8	4,7	5,9	6,0	8,0	—	—
Glycin	0-100	10,6	13,2	65,0	35,0	50,0	80,0
L-Histidin HCl	0-2	0,8	1,0	—	1,0	—	—
L-Hydroxyprolin	0-55	6,2	6,2	6,0	15,0	—	—
L-Isoleucin	0-12	0,7	0,9	2,0	3,0	—	—
L-Leucin	0-12	1,5	1,9	2,0	2,0	—	—
L-Lysin HCl	0-24	2,2	2,8	4,0	8,0	—	—
L-Methionin	0-4	0,3	0,4	—	1,0	—	—
L-Phenylalanin	0-10	0,9	1,1	1,0	2,0	—	—
L-Prolin	0-70	6,6	8,2	—	15,0	60,0	—
L-Serin	0-12	1,4	1,8	3,0	6,0	10,0	—
L-Threonin	0-10	1,0	1,2	1,0	3,0	—	—
L-Tryptophan	0	—	—	—	—	—	—
LTyrosin	0-3	0,2	1,0	1,0	1,0	—	—
L-Valin	0-20	1,2	—	2,0	4,0	—	—

- Key:
- 1 Amino acids
 - 2 Range
 - 3 L-alanine
 - L-arginine HCl
 - L-aspartic acid
 - L-cysteine
 - L-glutamic acid
 - Glycine
 - L-histidine HCl
 - L-hydroxyproline
 - L-isoleucine
 - L-leucine

L-lysine HCl
 L-methionine
 L-phenylalanine
 L-proline
 L-serine
 L-threonine
 L-tryptophan
 L-tyrosine
 L-valine

The amino acids mentioned in Tables 2-5 predominately stand for amino acids of plant origin.

Table 3. Examples 7-12 (in each case in g/L preparation)

Aminosäuren ①	② Bereich	EAS-1	EAS-2	EAS-3	EAS-4	EAS-5	EAS-6
L-Alanin	0-100	2,5	10,55	20,0	25,0	50,0	50,0
L-Arginin HCl	0-50	0,2	0,65	1,5	8,0	—	—
L-Asparaginsäure	0-5	0,15	0,5	1,0	5,0	—	—
L-Cystein	0-0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	—	—
L-Glutaminsäure	0-10	0,3	1,2	3,0	5,0	—	—
Glycin	0-100	4,0	12,75	25,0	40,0	40,0	—
L-Histidin HCl	0-1	0,02	0,06	0,1	0,15	—	—
③ L-Hydroxyprolin	0-10	0,2	0,75	5,0	10,0	—	—
L-Isoleucin	0-15	0,6	1,85	3,0	5,0	—	—
L-Leucin	0-12	2,0	4,3	5,0	5,0	—	—
L-Lysin HCl	0-30	0,1	0,25	2,0	3,0	—	—
L-Methionin	0	—	—	—	—	—	—
L-Phenylalanin	0-10	1,0	2,95	3,0	3,0	—	—
L-Prolin	0-40	2,0	5,8	8,0	20,0	20,0	40,0
L-Serin	0-20	0,2	0,45	1,0	2,0	—	—
L-Tryptophan	—	—	—	—	—	—	—
LTyrosin	0-3	0,2	0,65	1,0	1,5	—	—
L-Valin	0-20	3,0	8,25	10,0	12,0	—	—

Key: 1 Amino acids
 2 Range
 3 L-alanine
 L-arginine HCl
 L-aspartic acid
 L-cysteine
 L-glutamic acid
 Glycine
 L-histidine HCl
 L-hydroxyproline
 L-isoleucine
 L-leucine
 L-lysine HCl
 L-methionine
 L-phenylalanine

L-proline
L-serine
L-threonine
L-tryptophan
L-tyrosine
L-valine

Table 4. Examples 13-18 (in each case in g/L preparation)

/5

Aminosäuren ①	② Bereich	KAS-1	KAS-2	KAS-3	KAS-4	KAS-5	KAS-6
L-Alanin	0-20	0,2	2,2	7,0	10,0	10,0	—
L-Arginin HCl	0-20	0,2	2,15	6,5	8,0	15,0	—
L-Asparaginsäure	0-5	0,4	3,85	4,0	4,0	—	—
L-Cystein	0-0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	—	—
L-Glutaminsäure	0-8	0,6	6,25	6,0	6,0	—	—
Glycin	0-100	1,0	10,0	30,0	35,0	—	80,0
L-Histidin HCl	0-1	0,1	1,0	1,0	1,0	—	—
③ L-Hydroxyprolin	—	—	—	—	—	—	—
L-Isoleucin	0-10	0,2	1,85	5,5	6,0	—	—
L-Leucin	0-12	0,4	3,35	6,0	8,0	—	—
L-Lysin HCl	0-25	0,25	2,3	12,0	15,0	20,0	—
L-Methionin	0-4	0,1	0,5	1,5	2,0	—	—
L-Phenylalanin	0-8	0,2	1,5	4,0	2,0	—	—
L-Prolin	0-22	0,25	2,2	8,0	10,0	—	—
L-Serin	0-15	0,7	6,7	10,0	12,0	15,0	—
L-Threonin	0-10	0,2	1,85	5,0	6,0	10,0	10,0
L-Tryptophan	0-0,5	0,05	0,2	0,2	0,2	—	—
L-Tyrosin	0-3	0,2	1,5	1,5	1,5	—	—
L-Valin	0-15	0,2	1,8	3,0	4,0	—	—

Key: 1 Amino acids
2 Range
3 L-alanine
L-arginine HCl
L-aspartic acid
L-cysteine
L-glutamic acid
Glycine
L-histidine HCl
L-hydroxyproline
L-isoleucine
L-leucine
L-lysine HCl
L-methionine
L-phenylalanine
L-proline
L-serine
L-threonine
L-tryptophan
L-tyrosine
L-valine

Table 5. Examples 19-24 (in each case in g/L preparation)

Aminosäuren ①	② Bereich	BAS-1	BAS-2	BAS-3	BAS-4	BAS-5	BAS-6
L-Alanin	0-50	4,1	5,3	7,0	11,0	20,0	—
L-Arginin HCl	0-50	4,2	5,2	7,0	10,0	20,0	—
L-Asparaginsäure	0-5	0,3	3,5	4,0	4,0	—	—
L-Cystein	0-0,1	0,01	0,01	0,01	0,01	—	—
L-Glutaminsäure	0-6	4,7	5,0	5,0	5,0	—	—
Glycin	0-80	10,6	13,5	20,0	25,0	40,0	20,0
L-Histidin HCl	0-1	0,8	1,0	1,0	1,0	—	—
L-Hydroxyprolin	0-50	6,2	6,2	10,0	12,0	10,0	—
L-Isoleucin	0-9	0,7	0,9	2,0	3,0	—	—
L-Leucin	0-10	1,5	2,0	3,0	4,0	—	—
L-Lysin HCl	0-25	2,2	2,8	5,0	10,0	20,0	—
L-Methionin	0-4	0,3	0,4	0,6	0,0	—	—
L-Phenylalanin	0-10	0,9	1,2	1,5	2,0	—	—
L-Prolin	0-70	6,6	8,3	12,0	16,0	30,0	60,0
L-Serin	0-12	1,4	1,8	3,0	5,0	—	—
L-Threonin	0-10	1,0	1,2	2,0	3,0	10,0	10,0
L-Tryptophan	0-0,1	0,001	0,001	0,001	0,01	—	—
L-Tyrosin	0-2	0,2	0,2	0,3	0,4	—	—
L-Valin	0-15	1,2	1,7	—	—	—	—

- Key: 1 Amino acids
 2 Range
 3 L-alanine
 L-arginine HCl
 L-aspartic acid
 L-cysteine
 L-glutamic acid
 Glycine
 L-histidine HCl
 L-hydroxyproline
 L-isoleucine
 L-leucine
 L-lysine HCl
 L-methionine
 L-phenylalanine
 L-proline
 L-serine
 L-threonine
 L-tryptophan
 L-tyrosine
 L-valine

Table 6. Example 25-30 (in each case mg/L preparation)

/6

Peptide ①	② Bereich	CP-1	CP-2	CP-3	CP-4	CP-5	CP-6
X-Y-Ala-Ala-X-Y	0,2–20	1	3	5	20	—	—
X-Y-Ala-Gly-X-Y	0,2–30	2	12	20	—	—	—
X-Y-Ala-Pro-X-Y	—	—	—	—	—	—	—
X-Y-Arg-Gly-X-Y	0,2–30	0,25	1	2	—	—	—
X-Y-Gly-Ala-X-Y	0,2–20	4	7	10	—	—	—
X-Y-Gly-Glu-X-Y	0,2–25	2	4	10	—	—	—
X-Y-Gly-Gly-X-Y	1,0–200	75	25	30	200	—	200
X-Y-Gly-Ser-X-Y	1,0–40	1	2	5	—	—	—
X-Y-Gly-Leu-X-Y	1,0–100	5	10	20	50	—	50
X-Y-Gly-Pro-X-Y	0,2–20	1	2	5	—	—	—
X-Y-Gly-Thr-X-Y	0,2–20	1	2	5	—	—	—
X-Y-Gly-Val-X-Y	0,5–40	2	5	5	—	—	—
X-Y-Pro-Gly-X-Y	0,5–30	1,5	3	3	—	—	—
X-Y-Pro-Leu-X-Y	0,2–20	1	2	5	—	—	—
X-Y-Val-Gly-X-Y	—	—	—	—	—	—	—
X-Y-Val-Pro-X-Y	—	—	—	—	—	—	—
X-Y-Gly-Gly-Gly-X-Y	5,0–100	10	15	20	50	—	—
X-Y-Gly-Ala-Ala-X-Y	0,1–20	0,2	1	2	—	—	—
X-Y-Gly-Asp-Ser-X-Y	0,01–400	—	—	2	—	—	—
X-Y-Gly-His-Lys-X-Y	0,001–360	—	2	5	100	2	360
X-Y-Gly-Pro-Ala-X-Y	0,1–50	0,2	1	2	—	—	—
X-Y-Gly-Ser-Ala-X-Y	0,1–50	0,3	1	2	—	—	—
X-Y-Gly-Gly-Ala-X-Y	0,1–50	—	1	2	—	—	—
X-Y-Ala-Ala-Gly-X-Y	0,1–50	—	—	—	—	—	—
③ Tripeptidfraktion		2	—	—	—	—	—

Key: 1 Peptides
 2 Range
 3 Tripeptide fraction

The letters X, Y stand for amino acids of any type and in any quantity, in each case from 0 to a maximum of 50.

The peptides in Tables 6-8 can be used in the form of natural isolated peptides and/or in the form of synthetically manufactured peptides.

Table 7. Examples 31-36 (in each case mg/L preparation)

/7

Peptide ①	② Bereich	BP-1	BP-2	BP-3	BP-4	BP-5	BP-6
X-Y-Ala-Ala-X-Y	0,1-20	1	3	3	10	—	—
X-Y-Ala-Gly-X-Y	0,1-30	2	12	20	—	—	—
X-Y-Ala-Pro-X-Y	0,1-20	—	0,1	—	—	—	—
X-Y-Arg-Gly-X-Y	0,1-30	0,25	1	2	—	—	—
X-Y-Gly-Ala-X-Y	0,1-20	4	7	10	—	—	—
X-Y-Gly-Glu-X-Y	0,1-25	2	4	10	—	—	—
X-Y-Gly-Gly-X-Y	1,0-200	75	26	30	100	—	200
X-Y-Gly-Ser-X-Y	1,0-50	1	2	5	—	—	—
X-Y-Gly-Leu-X-Y	1,0-100	5	10	20	75	—	75
X-Y-Gly-Pro-X-Y	0,1-20	1	2	5	—	—	—
X-Y-Gly-Thr-X-Y	0,1-20	1	2	5	—	—	—
X-Y-Gly-Val-X-Y	0,2-50	2	5	5	—	—	—
X-Y-Pro-Gly-X-Y	0,2-30	1,5	3	3	—	—	—
X-Y-Pro-Leu-X-Y	0,1-20	1	2	5	—	—	—
X-Y-Val-Gly-X-Y	0,1-2	—	0,2	—	—	—	—
X-Y-Val-Pro-X-Y	0,1-2	—	0,3	—	—	—	—
X-Y-Gly-Gly-Gly-X-Y	2,0-100	10	15	20	50	—	—
X-Y-Gly-Ala-Ala-X-Y	0,1-20	0,2	1	2	—	—	—
X-Y-Gly-Asp-Ser-X-Y	0,01-400	—	—	2	—	—	—
X-Y-Gly-His-Lys-X-Y	0,001-360	—	2	5	100	2	360
X-Y-Gly-Pro-Ala-X-Y	0,1-50	0,2	1	2	—	—	—
X-Y-Gly-Ser-Ala-X-Y	0,1-50	0,3	1	2	—	—	—
X-Y-Gly-Gly-Ala-X-Y	0,1-50	—	1	2	—	—	—
X-Y-Ala-Ala-Gly-X-Y	0,1-50	—	1	2	—	—	—
③ Tripeptidfraktion	—	—	2	—	—	—	—
Hautpartialhydrolysat	1,0-500	—	500	—	—	—	—

Key: 1 Peptides
 2 Range
 3 Tripeptide fraction
 Skin partial hydrolysates

Table 8. Examples 37-42 (in each case in mg/L preparation)

Peptide ①	② Bereich	EP-1	EP-2	EP-3	EP-4	EP-5	EP-6
X-Y-Ala-Pro-X-Y	1-40	3	10	15	40	—	—
X-Y-Gly-Gly-X-Y	10-300	5	40	200	200	200	400
X-Y-Gly-Val-X-Y	5-340	4	25	25	—	25	—
X-Y-Val-Gly-X-Y	2-20	2	10	10	—	10	—
X-Y-Val-Pro-X-Y	1-30	3	3	3	—	—	—

Key: 1 Peptides
 2 Range

Table 9. Examples 43-48 (in each case in mg/L preparation)

Spurenelemente ①	② Bereich	CTS-1	CTS-2	CTS-3	CTS-4	CTS-5	CTS-6
③ Eisen-(II)-lactat	0,1–50 mg	—	—	—	—	—	—
Magnesiumsulfat	1,0–2000 mg	—	50,0	1600	1600	1600	1600
Natriummolybdat	0,1–1 mg	—	0,5	0,8	0,8	0,8	1,0
Mangansulfat	1,0–10 mg	—	0,5	0,8	0,8	0,8	1,0
Zinksulfat	0,1–10 mg	—	—	—	—	—	—
Cobaltsulfat	0,01–0,5 mg	—	0,05	0,08	0,08	0,08	0,1

Key: 1 Trace elements
 2 Range
 3 Iron(II) lactate
 Magnesium sulfate
 Sodium molybdate
 Manganese sulfate
 Zinc sulfate
 Cobalt sulfate

Table 10. Examples 49-54 (in each case in mg/L preparation)

Spurenelemente	Bereich	BTS-1	BTS-2	BTS-3	BTS-4	BTS-5	BTS-6
Eisen-(II)-lactat	0,1–50 mg	10,0	20,0	50,0	20,0	20,0	20,0
Magnesiumsulfat	1,0–2000 mg	50,0	50,0	2000	2000	2000	2000
Natriummolybdat	0,1–1 mg	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Mangansulfat	1,0–10 mg	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Zinksulfat	0,1–10 mg	0,2	0,2	—	1,0	1,0	1,0
Cobaltsulfat	0,02–0,5 mg	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Key: 1 Trace elements
 2 Range
 3 Iron(II) lactate
 Magnesium sulfate
 Sodium molybdate
 Manganese sulfate
 Zinc sulfate
 Cobalt sulfate

Table 11. Examples 55-60 (in each case in g/L preparation)

Antioxidantien, ① Radikalfänger und Hilfsstoffe	② Bereich	CAH-1	CAH-2	CAH-3	CAH-4	CAH-5	CAH-5
Natriumascorbat	0,5–30 g	1,0	1,0	0,8	—	—	—
Mannit	10,0–30 g	20,0	20,0	15,0	—	—	—
Sorbit	10,0–500 g	—	—	15,0	100,0	50,0	—
③ Glycerin	10,0–900 g	50,0	50,0	80,0	100,0	100,0	900,0
Natriumlactatlösung	10,0–500 g	20,0	20,0	15,0	—	—	—
Citronensäure	1,0–100 g	—	20,0	15,0	1,0	1,0	—
Ethanol	1,0–300 g	—	16,0	12,0	—	—	—
Panthenol	10,0–500 g	—	—	105,0	110,0	200,0	—
Sojapeptide	0,1–300 g	1,0	1,0	1,5	1,4	1,4	1,4
Hydroxybenzoesäure- methylester-Natriumsalz	1,0–2 g	1,0	2,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Phenonip	2,0–4 g	2,0	—	2,0	2,0	2,0	2,0

- Key: 1 Antioxidants, radical scavengers and adjuvants
 2 Range
 3 Sodium ascorbate
 Mannitol
 Sorbitol
 Glycerol
 Sodium lactate solution
 Citric acid
 Ethanol
 Panthenol
 Soy peptides
 Hydroxybenzoic acid methyl ester sodium salts
 Phenonip

Table 12. Examples 61-66 (in each case in g/L preparation)

Antioxidantien, ① Radikalfänger und Hilfsstoffe	② Bereich	BAH-1	BAH-2	BAH-3	BAH-4	BAH-5	BAH-5
Natriumascorbat	0,5–30 g	1,0	3,0	—	2,0	—	—
Mannit	10,0–30 g	20,0	25,0	—	—	—	—
③ Sorbit	10,0–500 g	10,0	100,0	50,0	50,0	50,0	—
Glycerin	10,0–900 g	50,0	50,0	50,0	50,0	100,0	200,0
Natriumlactatlösung	10,0–500 g	15,0	20,0	20,0	20,0	20,0	—
Citronensäure	1,0–100 g	10,0	10,0	10,0	2,0	2,0	2,0
Ethanol	1,0–300 g	12,0	10,0	10,0	—	—	—
Panthenol	10,0–500 g	—	100,0	200,0	300,0	200,0	500,0
Sojapeptide	0,1–50 g	1,0	1,0	1,5	1,4	1,4	1,4
Hydroxybenzoesäure- methylester-Natriumsalz	1,0–2 g	2,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Phenonip	2,0–4 g	—	—	2,0	2,0	2,0	2,0

- Key: 1 Antioxidants, radical scavengers and adjuvants
 2 Range

- 3 Sodium ascorbate
 Mannitol
 Sorbitol
 Glycerol
 Sodium lactate solution
 Citric acid
 Ethanol
 Panthenol
 Soy peptides
 Hydroxybenzoic acid methyl ester sodium salts
 Phenonip

Table 13. Example 66-72 (in each case in g/L preparation)

Weitere Inhaltsstoffe ①	② Bereich	CMS-1	CMS-2	CMS-3	CMS-4	CMS-5	CMS-6
③ Saccharide:							
Glucose	1,0–200 g	—	20,0	15,0	50,0	100,0	150,0
Galaktose	1,0–30 g	5,0	—	—	20,0	—	—
Mannose	—	—	—	—	—	—	—

- Key: 1 Additional components
 2 Range
 3 Saccharides:
 Glucose
 Galactose
 Mannose

Table 14. Examples 73-78 (in each case in µg, mg or g/L preparation)

Weitere Inhaltsstoffe ①	② Bereich	BMS-1	BMS-2	BMS-3	BMS-4	BMS-5	BMS-6
③ Saccharide:							
Glucose	1,0–200 g	5,0	50,0	—	100,0	50,0	—
Galaktose	0,5–50 g	0,5	2,0	—	10,0	—	20,0
Mannose	0,5–50 g	0,5	2,0	20,0	20,0	—	—
④ Nukleotide/Nukleoside:							
Adenin	5,0–50 mg	15,0	—	30,0	25,0	20,0	—
Adenosin	5,0–40 mg	18,0	20,0	30,0	—	20,0	40,0
Cytidin	5,0–30 mg	20,0	—	25,0	30,0	25,0	—
Cytosin	5,0–30 mg	20,0	—	25,0	—	25,0	—
Guanin	3,0–25 mg	15,0	—	25,0	20,0	—	—
Guanosin	3,0–25 mg	18,0	—	25,0	—	25,0	—
Thymin	5,0–50 mg	20,0	—	40,0	40,0	35,0	50,0
Thymidin	5,0–50 mg	20,0	—	50,0	—	30,0	—
Inosin	10,0–100 mg	50,0	100,0	60,0	70,0	50,0	100,0
⑤ Proteine/Mucopolysaccharide:							
Hyaluronsäure	1,0–50 g	—	1,0	3,0	—	—	—
Chondroitinsulfat	1,0–50 g	—	1,0	10,0	10,0	5,0	—
Laminin	1,0–50 µg	—	1,0	3,0	3,0	3,0	5,0
Entactin	1,0–50 µg	—	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Fibrillin	1,0–50 µg	—	1,0	1,0	1,0	5,0	5,0
Vitronectin	1,0–50 µg	—	1,0	10,0	10,0	20,0	25,0
Fibronectin	1,0–100 µg	—	1,0	100,0	100,0	300,0	300,0
Nidogen	1,0–50 µg	—	1,0	2,0	2,0	5,0	5,0
Tanescin	1,0–50 µg	—	1,0	2,0	2,0	3,0	3,0
Filagrin	1,0–50 µg	—	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0

- Key: 1 Additional components
 2 Range
 3 Saccharides:
 Glucose
 Galactose
 Mannose
 4 Nucleotide/nucleoside:
 Adenine
 Adenosine
 Cytidine
 Cytosine
 Guanine
 Guanosine
 Thymine
 Thymidine
 Inosine
 5 Protein/Mucopolysaccharides:
 Hyaluronic acid
 Chondroitin sulfate
 Laminin
 Entactin
 Fibrillin
 Vitronectin

Fibronectin
Nidogen
Tanescin
Filagrin

Manufacture of Preparation A

1 kg of denatured collagen (gelatin) is suspended in 9 kg 1N HCl solution, and the solution is dissolved. The solution is rapidly heated to 100°C in a hermetically sealed vessel under stirring, the temperature is kept constant for 3 h, and then cooled again to room temperature and neutralized with 6N NaOH solution. The preparation is desalted by gel chromatography or other suitable methods and/or the volume is brought to 20 L with distilled water, 0.2% preservative (for example phenonip or hydroxybenzoic acid ester) is used for preservation, and then the preparation is subjected to sterile filtration. Figure 1 gives an overview of the amino acids and peptides in preparation A. Figure 1 is the result of two-dimensional thin layer chromatography. Figure 2 with a standard amino acid mixture is used for comparison, where the mixture was chromatographically separated under the same conditions. In contrast, Figure 1A shows the amino acids and peptides after insufficient partial hydrolysis. The biological efficacy of preparation A was tested by a determination of the metabolic activation in rat liver mitochondria. Preparation A caused a 60% increase in metabolism compared to the control.

For the stabilization of the peptides, preparation A contained the recipe fraction CAH-1 (Table 11, Example 55).

Manufacture of preparation B

Preparation B contains the recipe fraction CAS-1, CTS-2, CAH-2 CMS 2 and CP-1. Use 0.6 kg distilled water and first dissolve the easily soluble amino acids. The amino acids which are difficult to dissolve (aspartic acid, glutamic acid, leucine, phenylalanine, tyrosine, valine) are predissolved into 2N NaOH solution. After the addition of citric acid, the pH of the solution is maintained at 5-9 with 10N NaOH and is adjusted to 6.5 after complete dissolution of the citric acid. Then the following were added: mannitol, glucose, ascorbate, sodium lactate, ethanol, glycerol, soy peptides, dipeptides, tripeptides, tripeptide fraction, trace elements and hydroxybenzoic acid methyl ester sodium salt. The pH was adjusted to 6.5 with 6N HCl. The preparation was brought up to a total preparation quantity of 1 L with distilled water, and subjected to sterile filtration under sterile conditions.

Isolation of the tripeptide fraction A and the tripeptide fraction B

The above described preparation A is separated, preferably by high resolution column chromatography, for example using silica gel 60 as absorbent and with elution solutions, preferably butanol/acetic acid/water 4:1:1, and propanol/ammonia (25%) 7:3, in a at least two elution steps to isolate a tripeptide which can be characterized analytically as follows: After acid hydrolysis, 24 h in 6N HCl at 105°C, three amino acids are released, which, as determined by one-dimensional thin layer chromatography, have the following hRf values: hRf values 34, 42, 11 for amino acids 1-3 in the mobile phase 96% ethanol/34% ammonia at the ratio of 7:3 and hRf values 32, 20 and 2 for amino acids 1-3 in the mobile phase 1-propanol/water in the ratio 7:3. After the sequence analysis, the numbering of the amino acids 1-3 corresponds to their positions in the tripeptide, starting with the amino-terminal amino acids. Thus, the tripeptide fraction A is identified as the tripeptide Gly-His-Lys.

The corresponding steps are applied to identify the peptide fraction B as the tripeptide Gly-Asp-Ser. Instead of the isolated tripeptide, one can also use the corresponding tripeptides which are synthesized and purified according to conventional methods.

Preparation of peptide-trace element complexes

An additional process step in the manufacture of the peptide fraction consists in complexing either the isolated or the synthesized tripeptide with copper: 0.01 mol/L tripeptide mixed with 0.01 mol/L copper(II) acetate monohydrate and neutralized with 0.1N NaOH. The tripeptide fraction is stored in small portions at cool temperatures.

Demonstration of the action of preparation A, preparation B and the tripeptides

The biological efficacy of the tripeptide was tested on human skin fibroblasts, among other cells, in the cell culture test (Figure 3). After the addition of 10⁻⁸ or 10⁻¹¹ mol/L tripeptide to the cell culture nutrient medium, the collagen production of the human skin fibroblasts was increased by 50-250% compared to the control.

The preparation B, in another biochemical investigation, revealed an 80% increase in the metabolism of liver mitochondria compared to the control.

A slightly different preparation B, which contains the recipe fraction CAS-3, CP-5, CTS-3, CAH-3 and CMS-2 causes an 80% increase of the metabolism in liver mitochondria and, in addition, it has the capacity of producing up to 40% inactivation of the hydroxyl radicals (Figure 6).

In this specific quantitative radical scavenger test, highly reactive hydroxyl radicals are released as a result of the action of the enzyme xanthinoxidase on the substrate xanthin in a chain reaction. The viscose hyaluronic acid in the aqueous test solution is decomposed by the hydroxyl

radicals within 40 min, where the degradation can be measured by the rapid, large decrease in the viscosity. The measured value of the decrease in the viscosity depends on the total amount of the hydroxyl radicals, and the quantity and the quality of any hydroxyl radical scavengers present, which clearly inhibit the decrease in the viscosity.

Manufacture of preparation C

Preparation C contains the recipe fractions AS-1, BP-2, BAH-1, BMS-1 and BTS-1. Use 0.6 kg of distilled water, and the easily soluble amino acids are added under stirring. The amino acids which are difficult to dissolve are predissolved in 2N NaOH. Guanine is dissolved in 3N HCl under heating to approximately 60°C. The predissolved amino acids are stirred into the preparation. After the addition of citric acid, the pH of the solution is regulated with 10N NaOH so it does not fall below 5 and does not increase above 9. After complete dissolution of the citric acid, the guanine HCl solution is stirred in, and the pH is adjusted to 6.5. The following are then added: mannitol, sorbitol, sodium lactate solution, glycerol, ethanol, sodium ascorbate, saccharides, peptides, nucleotides, tripeptide fraction, skin partial hydrolysate (with reference to the dry weight), trace elements and hydroxybenzoic acid methyl ester sodium salt. The pH is adjusted to 6.5 with 6N HCl, the preparation is brought up to a total volume of 1 L with distilled water and subject to sterile filtration under sterile conditions.

The tripeptide fraction corresponds to the above description (see manufacture of the tripeptide fractions A and B).

Manufacture of the skin partial hydrolysate

/11

Washed calf skin from which the subcutaneous fat tissues had been removed is crushed; 3 kg of crushed tissue (wet weight) are suspended in 7 kg of 1.5N HCl, dissolved, and rapidly heated in a hermetically closed vessel under stirring to 100°C. After 3 h at 100°C, the preparation is again cooled rapidly to room temperature and neutralized with 10N NaOH solution. After several filtration steps through deep layer filters, the purified extract is preserved with 0.2% hydroxybenzoic acid methyl ester sodium salt, the pH of the solution is adjusted to 6.5, and the solution is subjected to sterile filtration under sterile conditions. After the determination of the dry weight, the corresponding volume of the skin partial hydrolysate – with reference to the dry weight – is introduced into the preparation.

The biological efficacy of the semi-synthetic connective tissue extract was tested in rat liver mitochondria. An increase in the metabolic activity of approximately 80% was measured.

Application Examples 1 and 2Biotechnology in medicine

Application Example 1

Biotechnology

To stimulate cell growth or the synthesis of metabolic products, approximately 1-5% of the preparation described in this invention is added to serum deficient or serum free cell culture media. The cell culture nutrient solution for skin fibroblasts has the following composition:

94% Dulbecco's Minimal Essential Medium, including 2 mmol/L glutamine,

5% fetal calf serum

Application Example 2

Medicine

To promote wound healing, approximately 2-5% of the described preparations or at least 50-200 mg Gly-His-Lys/kg are incorporated into medicinal ointments, creams, lotions, tinctures, wound healing sprays, or dressings are impregnated therewith.

Application Examples 3-5

Cosmetics

At least three properties of the effect of the preparations described in this invention suggest a possible successful application in skin care: the increase in the metabolic activity, the radical scavenger effect, and the stimulation of collagen synthesis of fibroblasts.

The cosmetic preparations for skin care: hydrating and day creams for dry skin, night creams, sun protection preparations, after-sun lotions, anti-wrinkle creams, skin protection creams and aftershave lotions should contain a minimum concentration of 2-5% of the preparations described in this invention.

Application Example 3

Hydrating Cream

A. Paraffin liquid	1.5%
Lanette O	3.0%
Isopropylmyristate	4.0%
Abil A V 200	1.0%
Aracel 165	6.5%
Emulsifier G-1790	3.8%
Propyl-4-hydroxybenzoate	0.05%
Oxyhex 2004	0.02%

B. Allantoin	0.3%
Karion F liquid	6.0%
Methyl-4-hydroxybenzoate	0.2%
Demineralized water	65.43%
C. Collagen	5.0%
Preparation B.	3.0%
D. Perfume oil	0.3%

Manufacture

Melt phase A at 80°C and heat phase B to 80°C. Add B under stirring to A. At 30°C, stir phases C and D.

Application Example 4

Day Cream for Dry Skin

A. Tegomuls 90 S	6.25%
Sunflower seed oil	5.0%
Peanut oil	5.0%
Wheat germ oil	5.0%
Shea butter	5.0%
Phenonip	0.3%
B. Water, demineralized	66.85%
D-Panthenol 50%	1.0
Aloe vera	2.0%
Phenonip	0.3%
C. Preparation C	3.0%
D. Perfume oil	0.3%

Manufacture

Melt phase A at 75°C and heat phase B to 75°C. Stir B into A. Add under stirring, C at 45°C and D at 35°C.

Application Example 5

Sun Protection Cream

A. Ariacel 481	8.0%
Cremophor WO 7	2.0%
Elfacos ST 9	2.0%

Iso-adipate	12.0%
Permulin 3220	2.0%
White Vaseline	5.0%
Magnesium stearate	0.5%
Aluminum stearate	0.5%
Isopropylmyristate	10.0%
Univult 150	3.0%
B. 1,2-Propylene glycol	5.0%
Magnesium sulfate-7-hydrate	0.7%
Phenonip	0.25%
Water	45.75%
C. Preparation B	3.0%
D. Perfume oil	0.3%

Manufacture

Phase A and phase B are separately heated to 75°C, and phase B is slowly added to phase A under stirring, followed by homogenization and cold stirring. Add under stirring, C at 45°C and D at 35°C.

Claims

1. Preparation for cosmetics, pharmaceutical and biotechnological applications, characterized in that it contains the amino acid sequence Gly-His-Lys and/or Gly-Asp-Seer as tripeptide and/or partial section of peptides at a concentration of 10^{-12} to 10^{-2} mol/L.
2. Preparation according to Claim 1, characterized in that, after a mild hydrolysis of collagen, gelatin, hydrolyzed gelatin, elastin, keratin and connective tissue in 0.5-6.0N HCl for 0.1 h to 7 days at 20-121°C, it contains peptides and amino acids at a concentration of 10^{-12} to 1 mol/L.
3. Preparation according to one of the preceding claims, characterized in that it contains peptides at a concentration of 10^{-12} to 10^{-2} mol/L, which are obtained as a partial hydrolysate by enzymatic treatment with collagenase of *Clostridium histolyticum*.
4. Preparation according to one of the preceding claims, characterized in that the preparation contains mineral substances and trace elements each at a concentration of 10^{-7} to 10^{-1} mol/L, preferably Mg, Mn, Cu, Co, Fe, Se, Mo and/or Zn preferably in the form of complexes with the peptides.
5. Preparation according to one of the preceding claims, characterized in that it preferably contains, to increase the efficacy, the following components of skin and of connective tissues in

their natural or hydrolyzed form at a concentration of 10^{-12} to 2 mol/L: saccharides, sucroses, polysaccharides, mucopolysaccharides, laminin, entacin, fibrillin, vitronectin, fibronectin, nidogen, tanescin, filagrin, cytokines, chalcones, cell growth stimulating, cell growth inhibiting substances, immunomodulators of the skin, lipids, phospholipids, ceramids, glycosphingolipids, DNA, RNA, nucleotides, nucleosides, amino acids and/or enzyme of the skin.

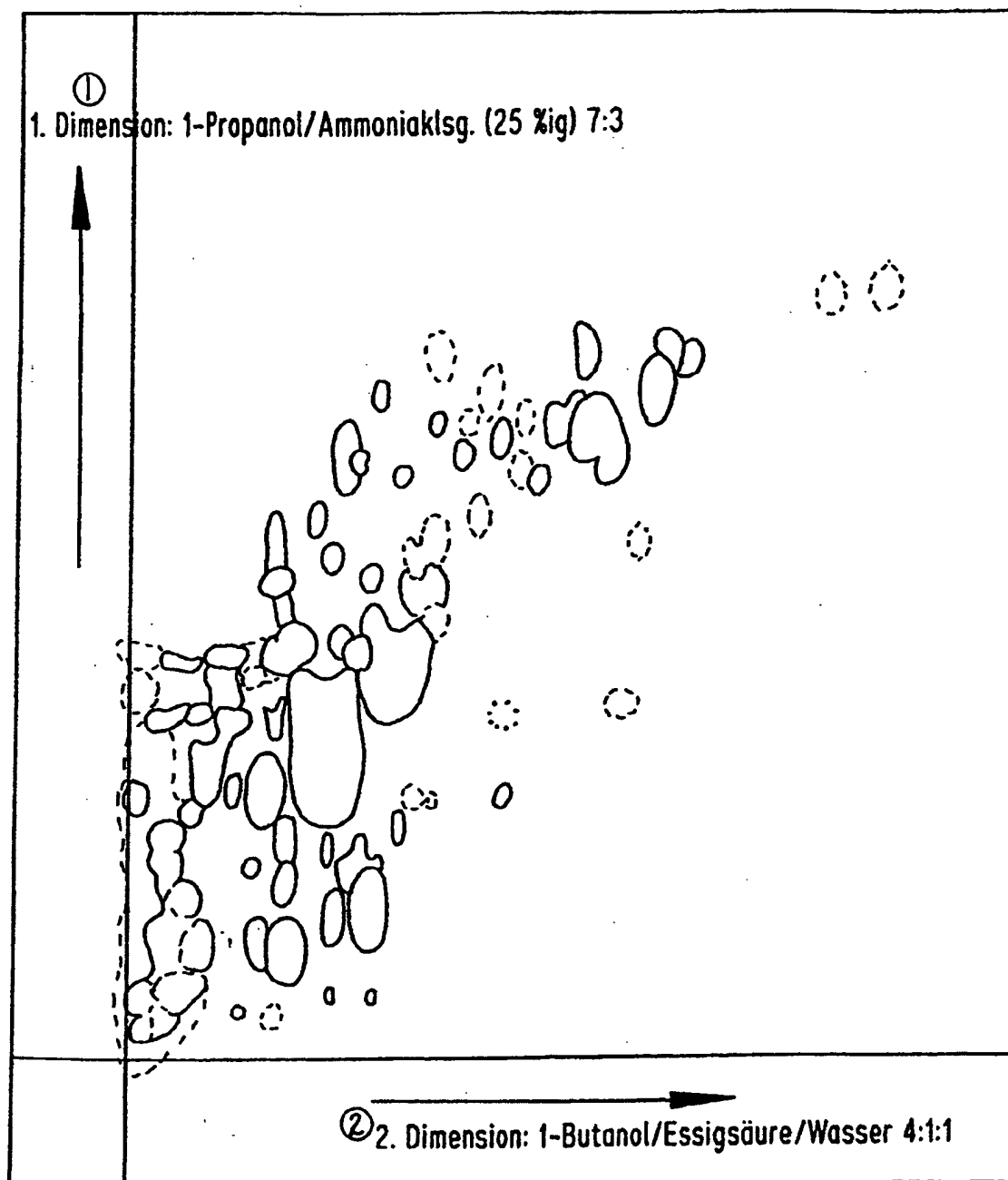
6. Preparation according to one of the preceding claims, characterized in that it contains, for reducing the adsorption of active peptides on the internal surface of glass vessels or plastic vessels, 0.01-30% of a peptide mixture, preferably 0.5% soy peptide.

7. Preparation according to one of the preceding claims, characterized in that it contains, for the reduction of the hydrolysis and the inactivation of the peptides, in each case 1-90% of water soluble antioxidants, radical scavengers and/or radical quenchers, preferably ascorbic acid, glycerol, mannitol and/or sorbitol.

8. Preparation according to one of the preceding claims, characterized in that, for the application, the concentration of the isolated peptides or the peptides in the partial hydrolysates is 10^{-12} to 10^{-1} mol/L, preferably 10^{-7} mol/L for the cosmetic application and 10^{-3} mol/L for the pharmaceutical application, with reference to the concentration of the peptides in the cosmetic, pharmaceutical and biotechnological end products.

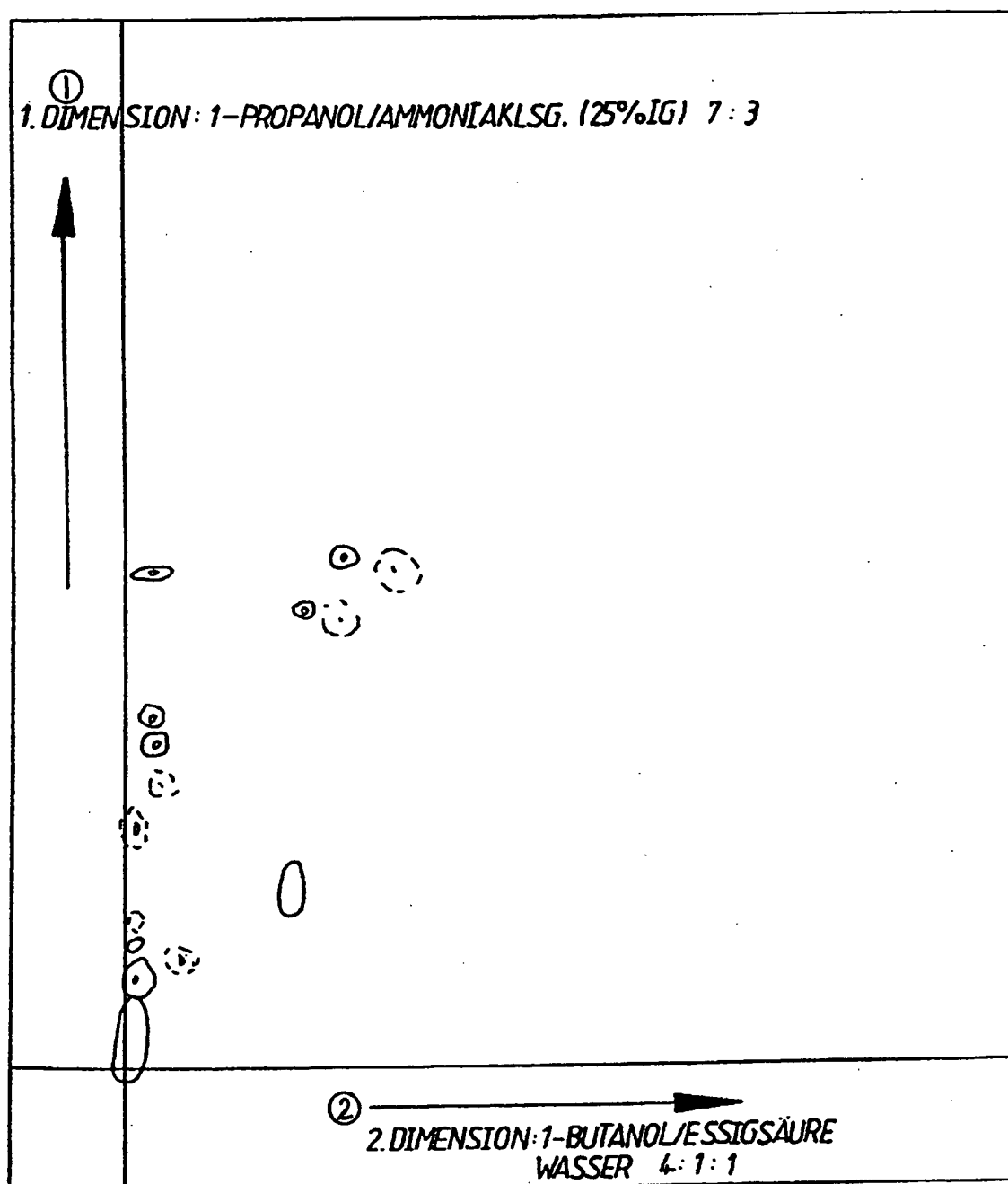
9. Preparation according to one of the preceding claims, characterized in that the spectrum of activity of the preparation is broadened in comparison to the unhydrolyzed starting materials, preferably with regard to an increase in cell respiration, stimulation of collagen synthesis and/or radical scavenger effect.

Figure 1. 2-dimensional thin layer chromatography of partially hydrolyzed gelatins



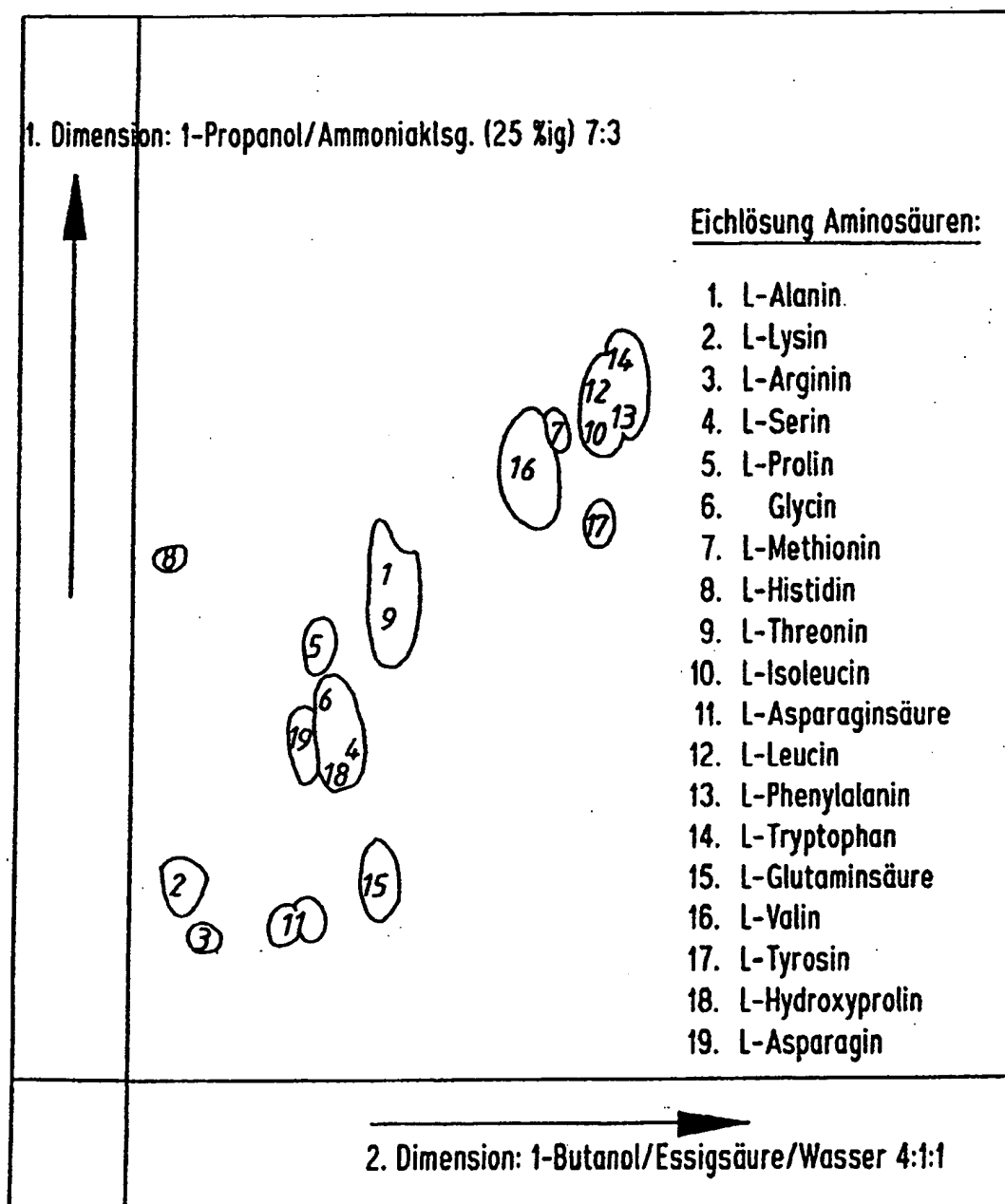
Key: 1 Dimension 1: 1-propanol/ammonia solution (25%) 7:3
 2 Dimension 2: 1-butanol/acetic acid/water 4:1:1

Figure 1A: 2-dimensional thin layer chromatography of partially hydrolyzed gelatins



Key: 1 Dimension 1: 1-propanol/ammonia solution (25%) 7:3
 2 Dimension 2: 1-butanol/acetic acid/water 4:1:1

Figure 2. Standard amino acid mixture after 2-dimensional thin layer chromatography, similar to a collagen total hydrolysate



Standard solution amino acids:

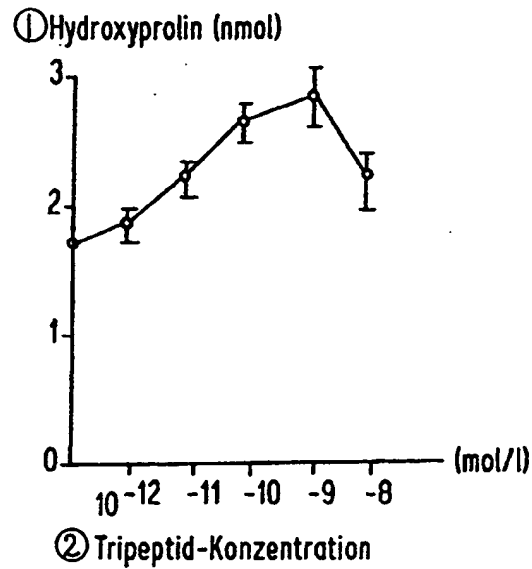
1. L-alanine
2. L-lysine
3. L-arginine
4. L-serine
5. L-proline
6. Glycine

7. L-methionine
8. L-histidine
9. L-threonine
10. L-isoleucine
11. L-aspartic acid
12. L-leucine
13. L-phenylalanine
14. L-tryptophan
15. L-glutamic acid
16. L-valine
17. L-tyrosine
18. L-hydroxyproline
19. L-asparagine

Key: 1 Dimension 1: 1-propanol/ammonia solution (25%) 7:3
 2 Dimension 2: 1-butanol/acetic acid/water 4:1:1

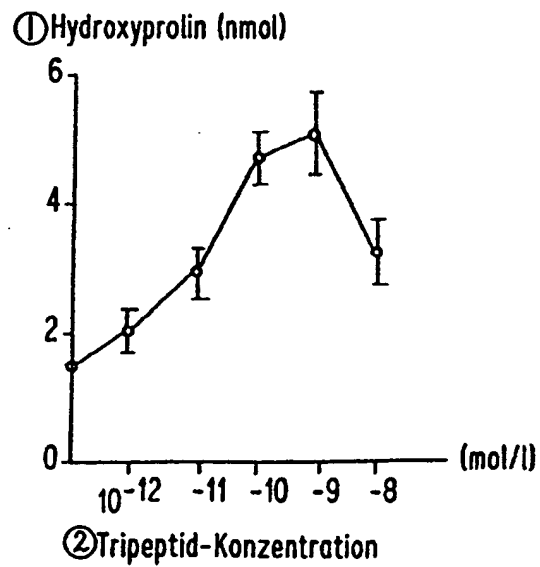
Figure 3. Effect of the isolated tripeptide on the collagen synthesis of fibroblasts of the human skin.

Figure 3.1.



Key: 1 Hydroxyproline (nmol)
2 Tripeptide concentration

Figure 3.2.



Key: 1 Hydroxyproline (nmol)
2 Tripeptide concentration

Figure 4. Amino acid partial sequence (Positions 1-360) of collagen type I, α -1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
	(extra-helical peptide, N-terminal):														
	(GLU-leu-ser-tyr-gly-tyr-ASP-GLU-LYS-ser-thr-gly-ile-ser-val-pro-)														
	gly-pro	-met	-gly-pro	-ser	-gly-pro	-ARG	gly-leu	-hyp	-gly-pro	-hyp-					
15	gly-ala	-hyp	-gly-pro	-gln	-gly-phe	-gln	-gly-pro	-hyp	-gly-GLU	-hyp-					
30	gly-GLU	-hyp	-gly-ala	-ser	-gly-pro	-met	-gly-pro	-ARG	-gly-pro	-hyp-					
45	gly-pro	-hyp	-gly-LYS	-asn	-gly-ASP	-ASP	-gly-GLU	-ala	-gly-LYS	-pro-					
60	gly-ARG	-hyp	-gly-GLU	-ARG	-gly-pro	-hyp	-gly-pro	-gln	-gly-ala	-ARG-					
75	gly-leu	-hyp	-gly-thr	-ala	-gly-leu	-hyp	-gly-met	-HYL	-gly-HIS	-ARG-					
90	gly-phe	-ser	-gly-leu	-ASP	-gly-ala	-LYS	-gly-ASP	-ala	-gly-pro	-ala-					
105	gly-pro	-LYS	-gly-GLU	-hyp	-gly-ser	-hyp	-gly-GLU	-asn	-gly-ala	-hyp-					
120	gly-gln	-met	-gly-pro	-ARG	-gly-leu	-hyp	-gly-GLU	-ARG	-gly-ARG	-hyp-					
135	gly-ala	-hyp	-gly-pro	-ala	-gly-ala	-ARG	-gly-asn	-ASP	-gly-ala	-ala-					
150	gly-ala	-ala	-gly	-pro	-hys	-gly-pro	-thr	-gly-pro	-thr	-gly-pro	-hyp-				
165	gly-phe	-hyp	-gly-ala	-val	-gly-ala	-LYS	-gly-GLU	-ala	-gly-pro	-GLU-					
180	gly-ala	-ARG	-gly-ser	-GLU	-gly-pro	-gln	-gly-val	-ARG	-gly-GLU	-hyp-					
195	gly-pro	-hyp	-gly-pro	-ala	-gly-ala	-ala	-gly	-pro	-ala	-gly-asn	-hyp-				
210	gly-ala	-ASP	-gly-gln	-hyp	-gly-ala	-LYS	-gly-ala	-asn	-gly-ala	-hyp-					
225	gly-ile	-ala	-gly-ala	-hyp	-gly-phe	-hyp	-gly-ala	-ARG	-gly	-pro	-ser-				
240	gly-pro	-GLU	-gly-pro	-ser	-gly-ala	-hyp	-gly-pro	-LYS	-gly-asn	-ser-					
255	gly-GLU	-hyp	-gly-ala	-hyp	-gly-asn	-LYS	-gly-ASP	-thr	-gly-ala	-LYS-					
270	gly-GLU	-hyp	-gly-pro	-ala	-gly-val	-gln	-gly-pro	-hyp	-gly-pro	-ala-					
285	gly-GLU	-GLU	-gly-LYS	-ARG	-gly-ala	-ARG	-gly-GLU	-hyp	-gly-pro	-ser-					
300	gly-leu	-hyp	-gly-pro	-hyp	-gly-GLU	-ARG	-gly-gly	-hyp	-gly-ser	-ARG-					
315	gly-phe	-hyp	-gly-ala	-ASP	-gly-val	-ala	-gly-pro	-LYS	-gly-pro	-ala-					
330	gly-GLU	-ARG	-gly-ser	-hyp	-gly-pro	-ala	-gly-pro	-LYS	-gly-ser	-hyp-					
345	gly-GLU	-ala	-gly-ARG	-hyp	-gly-GLU	-ala	-gly-leu	-hyp	-gly-ala	-LYS-					

Reference: Collagen in Health and Disease, Inside Cover Sheets

Editors, J. B. Weiss, M. I. V. Jayson, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1982

Figure 5. Amino acid partial sequence (Positions 1-360) of collagen type I, α -2

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

(extra-helical peptide, N-terminal):

(GLU-phe-ASP-ala-LYS-gly-gly-gly-pro-)

gly-pro-met-gly-leu-met-gly-pro-ARG-gly-pro-hyp-gly-ala-ser-

15 gly-ala-hyp-gly-pro-gln-gly-phe-gln-gly-pro-hyp-gly-GLU-hyp-

30 gly-GLU-hyp-gly-gln-thr-gly-pro-ala-gly-ala-ARG-gly-pro-hyp-

45 gly-pro-hyp-gly-LYS-ala-gly-GLU-ASP-gly-HIS-hyp-gly-LYS-pro-

60 gly-ARG-hyp-gly-GLU-ARG-gly-val-pro-gly-pro-gln-gly-ala-ARG-

75 gly-phe-hyp-gly-thr-hyp-gly-leu-hyp-gly-phe-HYL-gly-ile-ARG-

90 gly-HIS-asn-gly-leu-ASP-gly-leu-thr-gly-gln-hyp-gly-ala-hyp-

105 gly-val-HYL-gly-GLU-hyp-gly-ala-hyp-gly-GLU-asn-gly-thr-hyp-

120 gly-gln-HYL-gly-ala-ARG-gly-leu-hyp-gly-GLU-ARG-gly-ARG-val-

135 gly-ala-hyp-gly-pro-ala-gly-ala-ARG-gly-ser-ASP-gly-ser-val-

150 gly-pro-val-gly-pro-ala-gly-pro-ile-gly-ser-ala-gly-pro-hyp-

165 gly-phe-hyp-gly-ala-hyp-gly-pro-HYL-gly-GLU-leu-gly-pro-val-

180 gly-asn-hyp-gly-pro-ala-gly-pro-ala-gly-pro-ARG-gly-GLU-val-

195 gly-leu-hyp-gly-leu-ser-gly-pro-val-gly-pro-hyp-gly-asn-ala-

210 gly-pro-asn-gly-leu-hyp-gly-ala-HYL-gly-ala-ala-gly-leu-hyp-

225 gly-val-ala-gly-ala-hyp-gly-leu-hyp-gly-pro-ARG-gly-ile-hyp-

240 gly-pro-val-gly-ala-ala-gly-ala-thr-gly-ala-ARG-gly-leu-val-

255 gly-GLU-hyp-gly-pro-ala-gly-ser-HYL-gly-GLU-ser-gly-asn-LYS-

270 gly-GLU-hyp-gly-ala-val-gly-gln-hyp-gly-pro-hyp-gly-pro-ser-

285 gly-GLU-GLU-gly-LYS-ARG-gly-ser-thr-gly-GLU-ile-gly-pro-ala-

300 gly-pro-hyp-gly-pro-hyp-gly-leu-ARG-gly-asn-hyp-gly-ser-ARG-

315 gly-leu-hyp-gly-ala-ASP-gly-ARG-ala-gly-val-met-gly-pro-ala-

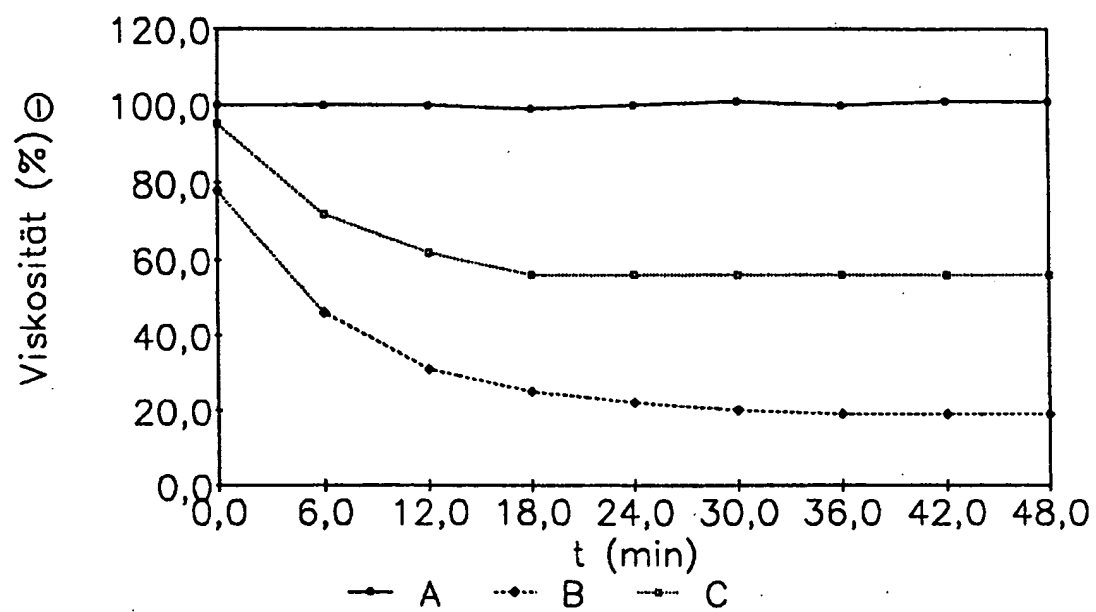
330 gly-ser-ARG-gly-thr-ser-gly-pro-ala-gly-val-ARG-gly-pro-asn-

345 gly-ASP-ser-gly-ARG-hyp-gly-GLU-hyp-gly-leu-met-gly-pro-ARG-

Reference: Collagen in Health and Disease, Inside Cover Sheets

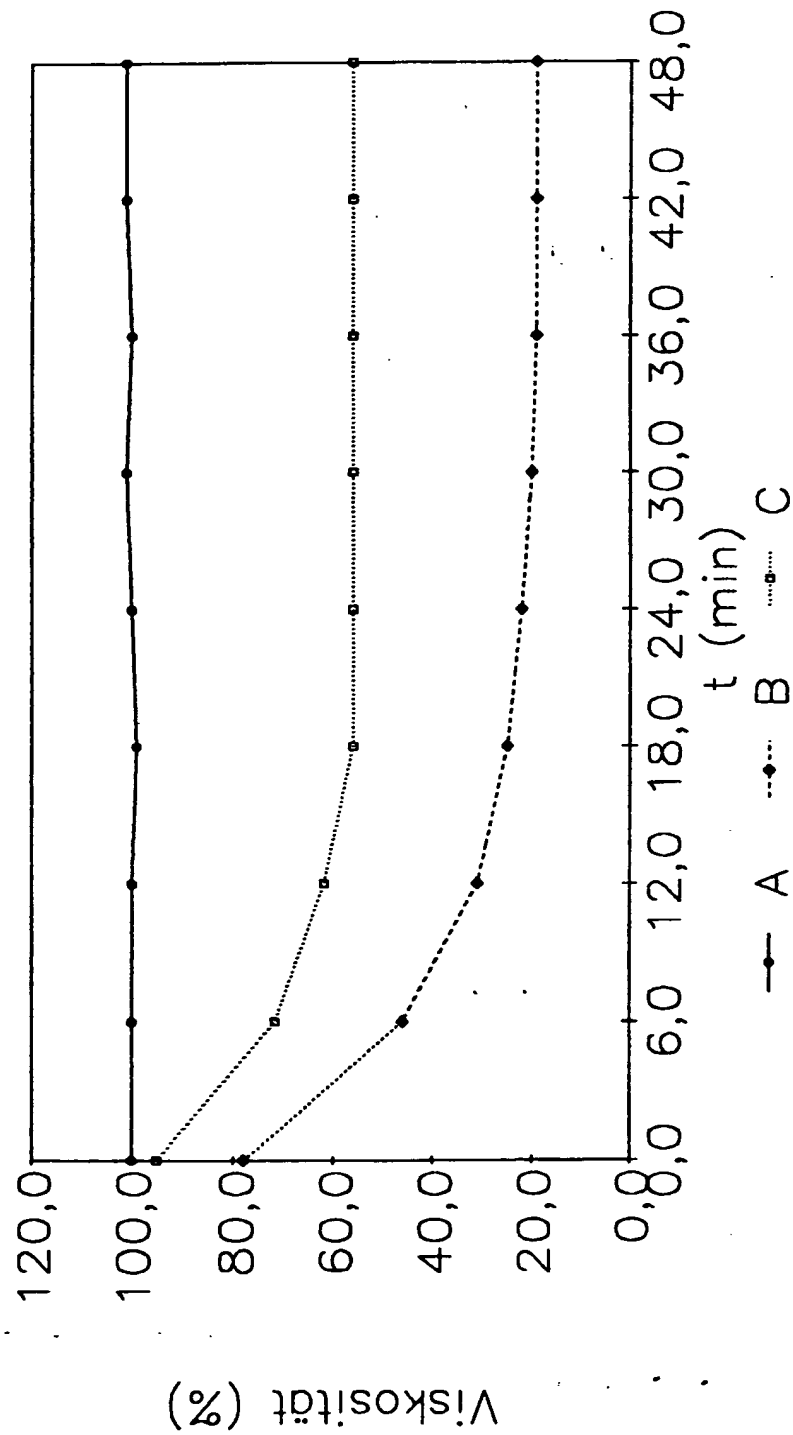
Editors, J. B. Weiss, M. I. V. Jayson, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1982

Figure 6: Determination of the radical scavenger effect



Key: 1 Viscosity (%)

Figur 6: Bestimmung
der Radikalfängerwirkung





⑬ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 42 44 418 A 1**

⑤ Int. Cl.⁵:
A 61 K 7/48
A 61 K 37/02

⑲ Aktenzeichen: P 42 44 418.7
⑳ Anmeldetag: 30. 12. 92
㉑ Offenlegungstag: 1. 7. 93

DE 42 44 418 A 1

③① Innere Priorität: ③② ③③ ③①
30.12.91 DE 41 43 178.2

⑦① Anmelder:
Quelle, Gerhard, 6948 Wald-Michelbach, DE

⑦④ Vertreter:
Hach, H., Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 7100 Heilbronn

⑦② Erfinder:
gleich Anmelder

⑤④ Peptid-Präparate und Verfahren zu deren Herstellung

⑤⑦ Die Erfindung betrifft Peptid-Präparate und Verfahren zu dessen Herstellung vorzugsweise durch partielle Hydrolyse von Bindegewebe, Kollagen, Elastin und Keratin, die Tripeptide oder Peptidsequenzen Gly-His-Lys und/oder Gly-Asp-Ser enthalten.

DE 42 44 418 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft Peptid-Präparate und Verfahren zu deren Herstellung.

Bei der Suche nach wirksamen Inhaltsstoffen aus tierischen Geweben für die Anwendung in der Medizin, Biotechnologie und Kosmetik wurden in den vergangenen Jahrzehnten eine große Zahl von Substanzen und Substanzgemischen extrahiert, vollständig oder partiell charakterisiert und erfolgreich angewandt. Stellvertretend seien nur einige wenige Substanzen erwähnt, wie Epidermal Growth Factor, Kollagen Typ I und Typ III und Hyaluronsäure (British Medical Bulletin, vol. 45, no. 2, 1989, "Growth Factors", ed. M. D. Waterfield, Churchill Livingstone, Edinburgh; Collagen in Health and Disease, eds. J. B. Weiss and M. I. V. Jayson, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1982; Methods in Enzymology, vol. 82, 1982, "Structural and Contractile Proteins, Part A", eds. L. W. Cunningham and D. W. Frederiksen, vol. 144, 1987, "Structural and Contractile Proteins, Part D", ed. L. W. Cunningham, Academic Press, Inc., Orlando).

Viele der bisher gefundenen Wirkstoffe sind sehr komplexe Moleküle, wie Proteine, Polypeptide oder Mucopolysaccharide, die aus kleinen Bausteinen von den Gewebezellen synthetisiert werden. Das Ziel bisheriger Bemühungen war im wesentlichen die Extraktion, mit eventuell anschließender chemisch-physikalischer Modifikation dieser komplexen Moleküle, um sie dann sinnvoll anzuwenden.

Durch enzymatischen oder chemisch-physikalischen Abbau verlieren diese Makromoleküle jedoch in der Regel ihre Wirkung oder erfahren Wirkungseinbußen oder Wirkungsverschiebungen. Wenn zum Beispiel Kollagen zu Gelatine abgebaut wird, verringert sich das für die Kosmetik wichtige Wasserbindevermögen [Parfümerie und Kosmetik 65 (7), 1984, 391 bis 401, Alexander Berg: "Einsatz von Proteinen in der Kosmetik"; RAK — Riechstoffe, Aromen, Kosmetica (7), 1977, R. Riemschneider, W. H. Chik: "Über das Wasserbindevermögen löslicher Kollagene"]. Beim weiteren Abbau von Gelatine zu Gelatinehydrolysat werden Peptide mit einem Molekulargewicht von 500 bis 30 000 Dalton freigesetzt, die im Vergleich zur Gelatine ein besseres Aufziehvermögen für Haare besitzen und daher im Bereich der Haarpflege große Bedeutung erlangt haben.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Entdeckung, daß die unter definierten Bedingungen gewonnenen Partialhydrolysate, die daraus isolierten Peptide und die Mischungen von Aminosäuren und Peptiden, deren Aminosäuresequenzen mit den Teilabschnitten der Protein-Aminosäuresequenz übereinstimmen, neue Wirkungseigenschaften besitzen, die über die Wirkung der intakten Proteine deutlich hinausgehen.

Als Beispiel wird kurz auf Kollagen Typ I hingewiesen.

Kollagene, von denen mindestens 13 unterschiedliche Typen isoliert und charakterisiert wurden, dienen vorwiegend als Strukturproteine im Bindegewebe multizellulärer Organismen. Spezifische Zellen, wie zum Beispiel Fibroblasten in der Dermis, synthetisieren die nadelförmigen Proteinmoleküle, die aus drei miteinander verdrehten, kabelähnlichen Polypeptiden zusammengesetzt sind. Bei Kollagen Typ I besitzen zwei der drei Polypeptide identische Aminosäuresequenzen und werden als α -1(I)-Polypeptide bezeichnet (Fig. 4), während das dritte Polypeptid, α -2(I), eine andere Aminosäuresequenz hat (Fig. 5). Jedes Polypeptid enthält etwa 1000 Aminosäuren. Das gesamte Protein hat eine Länge von ca. 0,3 μ m und einen Durchmesser von ca. 0,0015 μ m.

Wegen der filmbildenden Eigenschaften und des großen Wasseraufnahmevermögens wird Kollagen in bedeutenden Mengen in der Kosmetik eingesetzt. Die kosmetische Wirkung von Kollagen war bisher im wesentlichen auf diese Eigenschaften beschränkt, bedingt sowohl durch die chemische Struktur des Kollagens als auch durch die Molekülgröße, die ein Eindringen in die Haut verhindert.

Wenn dagegen ein Partialhydrolysat von Kollagen unter genau definierten Bedingungen hergestellt wird (siehe Herstellung Präparat A) oder ein Gemisch aus Aminosäuren und Peptiden zubereitet wird (Herstellung Präparat B), dessen Aminosäurezusammensetzung der Kollagen-Aminosäure-Analyse annähernd entspricht und dessen Peptide Aminosäuresequenzen haben, die mit bestimmten Kollagen-Aminosäuresequenzen exakt übereinstimmen (Fig. 4 und 5), so weisen diese Präparate neue positive Wirkungen und Eigenschaften auf.

Diese Wirkungen sind zum Teil in Tabelle 1 zusammengefaßt. Die wirksamen Präparate werden darin Präparat B und GHL-Peptid (GHL = Glycyl-Histidyl-Lysin = Tripeptidfraktion A) genannt, und sie werden mit den Eigenschaften des nativen Kollagens verglichen.

Tabelle 1

Wirkungsvergleich zwischen nativem Kollagen, Präparat B und dem GHL-Peptid

Wirkung/Eigenschaften	Kollagen	Präparat B	GHL-Peptid	
Feuchtigkeitsrückhaltevermögen	++	+	—	P
Zellatmungsaktivierend	—	++	—	P
(Stimulierung des Zellstoffwechsels)				
Pufferkapazität	+	++	—	P
Stimulierung der Kollagensynthese bei Fibroblasten	—	++	++	P
Förderung der Wundheilung	+	+	+	P
Radikalfängerwirkung	—	++	+	P
Superoxid-Dismutase-Wirkung	—	++	++	P
Immunstimulierende Wirkung	—	+	+	P
Penetrationsvermögen (Epidermis)	—	+	+	P
Gefahr durch Kontamination mit Säugetierviren	++	—	—	N
Denaturierung bei 30—37°C	++	—	—	N
P = Positive Eigenschaft N = Negative Eigenschaft				

Diese Partialhydrolysate, isolierten Peptide und Präparate aus Aminosäuren und Peptiden sind von besonderer Bedeutung

1. für die Biotechnologie, als Zusatz für Zellkultur-Nährlösungen für serumarme oder definierte, serumfreie Zellkultur-Nährmedien (Applikationsbeispiel 1),
2. für die Medizin, als wundheilungsförderndes Mittel (Applikationsbeispiel 2), zur Immunstimulation und Wirkstoff zur Erhöhung der körpereigenen Erythropoetinbildung, und
3. für die Kosmetik, zur Pflege der Haut, als Anti-Aging-Faktor und Radikalfängerkomplex (Applikationsbeispiele 3 bis 5).

Grundsätzliche Methoden der Herstellung

1. Synthetische Herstellung

Die Komponenten der Rezeptur (Tabellen 2 bis 14: Rezepturfractionen) werden in geeigneter Weise vorgelegt und gemischt. Einzelne Komponenten der Rezeptur, wie zum Beispiel die Tripeptidfraktion A und Tripeptidfraktion B, werden nach der Partialhydrolyse (grundsätzliche Methoden der Herstellung 3 bis 5) mit Hilfe chromatographischer Methoden gereinigt, isoliert, konzentriert und anschließend dem Präparat zugegeben.

2. Halbsynthetische Herstellung

Komponenten der Rezeptur werden mit gentechnologisch gewonnenen Substanzen und/oder mit Partialhydrolysaten (siehe grundsätzliche Methoden der Herstellung 3 bis 5) gemischt.

3. Partialhydrolysat mit verdünnter Salzsäure

Tierhaut oder Tierlunge, Kollagen, Gelatine oder Elastin werden, wie in Anspruch 2 beschrieben, hydrolysiert, anschließend filtriert, neutralisiert und mit Hilfe zum Beispiel der Umkehrosmose entsalzt. Gegebenenfalls erfolgt eine Behandlung mit 1N-NaOH, eine Stunde bei Zimmertemperatur, mit anschließender Neutralisation und erneuter Entsalzung.

4. Enzymatisches Partialhydrolysat mit Kollagenase aus *Clostridium histolyticum*

Dieses Enzym spaltet die sich wiederholende Gly-X-Y-Gly-X-Y-Gly-X-Y-Gly-Aminosäuresequenz des Kollagens zwischen dem Y und Glycin (X, Y stehen für unterschiedliche Aminosäuren in der Kollagen-Aminosäuresequenz). Tierhaut oder Tierlunge bzw. Kollagen Typ I wird in Tris-HCl-Puffer, pH 7,6, in Anwesenheit von CaCl_2 90 Minuten bei 37°C mit Kollagenase behandelt und die Lösung anschließend 24 Stunden bei +4°C dialysiert, konserviert und sterilfiltriert.

5. Partialhydrolysat von Hautkeratin mit Pepsin

Tierepidermis wird im Citrat-HCl-Puffer, pH 1,5, 24 Stunden bei Zimmertemperatur mit Pepsin behandelt (Verhältnis Pepsin zu Substrat 1 : 10), dialysiert, 24 Stunden bei pH 10,5 bei Zimmertemperatur gelagert, 1 Stunde mit 1N-NaOH bei Zimmertemperatur behandelt, neutralisiert, entsalzt und sterilfiltriert.

6. Gentechnisch gewonnene Proteinsequenzen

Geeignete Mikroorganismen werden nach bekannten Techniken so behandelt, daß sie veränderte Kollagen-, Elastin- und Hautkollagenmoleküle synthetisieren, die eine größere Anzahl wirksamer Peptidsequenzen enthalten. Diese veränderten Proteine erhöhen die Ausbeute bei der Gewinnung wirksamer Peptidsequenzen durch partielle Hydrolyse.

7. Natürliches Präparat

Das natürliche Präparat entspricht den Beschreibungen gemäß Anspruch 2 und den grundsätzlichen Methoden der Herstellung 3 bis 5.

Tabelle 2

Beispiele 1 bis 6 (jeweils g/L Präparat)

Aminosäuren	Bereich	CAS-1	CAS-2	CAS-3	CAS-4	CAS-5	CAS-6
L-Alanin	0—80	4,1	5,1	7,0	9,0	20,0	—
L-Arginin HCl	0—80	4,2	5,2	7,5	10,0	—	—
L-Asparaginsäure	0—5	2,8	3,5	4,0	5,0	—	—
L-Cystein	0	—	—	—	—	—	—
L-Glutaminsäure	0—8	4,7	5,9	6,0	8,0	—	—
Glycin	0—100	10,6	13,2	65,0	35,0	50,0	80,0
L-Histidin HCl	0—2	0,8	1,0	—	1,0	—	—
L-Hydroxyprolin	0—55	6,2	6,2	6,0	15,0	—	—
L-Isoleucin	0—12	0,7	0,9	2,0	3,0	—	—
L-Leucin	0—12	1,5	1,9	2,0	2,0	—	—
L-Lysin HCl	0—24	2,2	2,8	4,0	8,0	—	—
L-Methionin	0—4	0,3	0,4	—	1,0	—	—
L-Phenylalanin	0—10	0,9	1,1	1,0	2,0	—	—
L-Prolin	0—70	6,6	8,2	—	15,0	60,0	—
L-Serin	0—12	1,4	1,8	3,0	6,0	10,0	—
L-Threonin	0—10	1,0	1,2	1,0	3,0	—	—
L-Tryptophan	0	—	—	—	—	—	—
LTyrosin	0—3	0,2	1,0	1,0	1,0	—	—
L-Valin	0—20	1,2	—	2,0	4,0	—	—

Die in den Tabellen 2 bis 5 genannten Aminosäuren stehen vorwiegend für Aminosäuren pflanzlichen Ursprungs.

Tabelle 3

Beispiele 7 bis 12 (jeweils g/L Präparat)

Aminosäuren	Bereich	EAS-1	EAS-2	EAS-3	EAS-4	EAS-5	EAS-6
L-Alanin	0—100	2,5	10,55	20,0	25,0	50,0	50,0
L-Arginin HCl	0—50	0,2	0,65	1,5	8,0	—	—
L-Asparaginsäure	0—5	0,15	0,5	1,0	5,0	—	—
L-Cystein	0—0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	—	—
L-Glutaminsäure	0—10	0,3	1,2	3,0	5,0	—	—
Glycin	0—100	4,0	12,75	25,0	40,0	40,0	—
L-Histidin HCl	0—1	0,02	0,06	0,1	0,15	—	—
L-Hydroxyprolin	0—10	0,2	0,75	5,0	10,0	—	—
L-Isoleucin	0—15	0,6	1,85	3,0	5,0	—	—
L-Leucin	0—12	2,0	4,3	5,0	5,0	—	—
L-Lysin HCl	0—30	0,1	0,25	2,0	3,0	—	—
L-Methionin	0	—	—	—	—	—	—
L-Phenylalanin	0—10	1,0	2,95	3,0	3,0	—	—
L-Prolin	0—40	2,0	5,8	8,0	20,0	20,0	40,0
L-Serin	0—20	0,2	0,45	1,0	2,0	—	—
L-Tryptophan	—	—	—	—	—	—	—
LTyrosin	0—3	0,2	0,65	1,0	1,5	—	—
L-Valin	0—20	3,0	8,25	10,0	12,0	—	—

Tabelle 4

Beispiele 13 bis 18 (jeweils g/L Präparat)

Aminosäuren	Bereich	KAS-1	KAS-2	KAS-3	KAS-4	KAS-5	KAS-6	5
L-Alanin	0–20	0,2	2,2	7,0	10,0	10,0	—	
L-Arginin HCl	0–20	0,2	2,15	6,5	8,0	15,0	—	
L-Asparaginsäure	0–5	0,4	3,85	4,0	4,0	—	—	10
L-Cystein	0–0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	—	—	
L-Glutaminsäure	0–8	0,6	6,25	6,0	6,0	—	—	
Glycin	0–100	1,0	10,0	30,0	35,0	—	80,0	
L-Histidin HCl	0–1	0,1	1,0	1,0	1,0	—	—	
L-Hydroxyprolin	—	—	—	—	—	—	—	15
L-Isoleucin	0–10	0,2	1,85	5,5	6,0	—	—	
L-Leucin	0–12	0,4	3,35	6,0	8,0	—	—	
L-Lysin HCl	0–25	0,25	2,3	12,0	15,0	20,0	—	
L-Methionin	0–4	0,1	0,5	1,5	2,0	—	—	
L-Phenylalanin	0–8	0,2	1,5	4,0	2,0	—	—	20
L-Prolin	0–22	0,25	2,2	8,0	10,0	—	—	
L-Serin	0–15	0,7	6,7	10,0	12,0	15,0	—	
L-Threonin	0–10	0,2	1,85	5,0	6,0	10,0	10,0	
L-Tryptophan	0–0,5	0,05	0,2	0,2	0,2	—	—	
L-Tyrosin	0–3	0,2	1,5	1,5	1,5	—	—	25
L-Valin	0–15	0,2	1,8	3,0	4,0	—	—	

Tabelle 5

Beispiele 19 bis 24 (jeweils g/L Präparat)

Aminosäuren	Bereich	BAS-1	BAS-2	BAS-3	BAS-4	BAS-5	BAS-6	30
L-Alanin	0–50	4,1	5,3	7,0	11,0	20,0	—	35
L-Arginin HCl	0–50	4,2	5,2	7,0	10,0	20,0	—	
L-Asparaginsäure	0–5	0,3	3,5	4,0	4,0	—	—	
L-Cystein	0–0,1	0,01	0,01	0,01	0,01	—	—	
L-Glutaminsäure	0–6	4,7	5,0	5,0	5,0	—	—	40
Glycin	0–80	10,6	13,5	20,0	25,0	40,0	20,0	
L-Histidin HCl	0–1	0,8	1,0	1,0	1,0	—	—	
L-Hydroxyprolin	0–50	6,2	6,2	10,0	12,0	10,0	—	
L-Isoleucin	0–9	0,7	0,9	2,0	3,0	—	—	
L-Leucin	0–10	1,5	2,0	3,0	4,0	—	—	45
L-Lysin HCl	0–25	2,2	2,8	5,0	10,0	20,0	—	
L-Methionin	0–4	0,3	0,4	0,6	0,0	—	—	
L-Phenylalanin	0–10	0,9	1,2	1,5	2,0	—	—	
L-Prolin	0–70	6,6	8,3	12,0	16,0	30,0	60,0	
L-Serin	0–12	1,4	1,8	3,0	5,0	—	—	50
L-Threonin	0–10	1,0	1,2	2,0	3,0	10,0	10,0	
L-Tryptophan	0–0,1	0,001	0,001	0,001	0,01	—	—	
L-Tyrosin	0–2	0,2	0,2	0,3	0,4	—	—	
L-Valin	0–15	1,2	1,7	—	—	—	—	55

60

65

Tabelle 6

Beispiele 25 bis 30 (jeweils mg/L Präparat)

5	Peptide	Bereich	CP-1	CP-2	CP-3	CP-4	CP-5	CP-6
	X-Y-Ala-Ala-X-Y	0,2—20	1	3	5	20	—	—
	X-Y-Ala-Gly-X-Y	0,2—30	2	12	20	—	—	—
10	X-Y-Ala-Pro-X-Y	—	—	—	—	—	—	—
	X-Y-Arg-Gly-X-Y	0,2—30	0,25	1	2	—	—	—
	X-Y-Gly-Ala-X-Y	0,2—20	4	7	10	—	—	—
	X-Y-Gly-Glu-X-Y	0,2—25	2	4	10	—	—	—
	X-Y-Gly-Gly-X-Y	1,0—200	75	25	30	200	—	200
15	X-Y-Gly-Ser-X-Y	1,0—40	1	2	5	—	—	—
	X-Y-Gly-Leu-X-Y	1,0—100	5	10	20	50	—	50
	X-Y-Gly-Pro-X-Y	0,2—20	1	2	5	—	—	—
	X-Y-Gly-Thr-X-Y	0,2—20	1	2	5	—	—	—
	X-Y-Gly-Val-X-Y	0,5—40	2	5	5	—	—	—
20	X-Y-Pro-Gly-X-Y	0,5—30	1,5	3	3	—	—	—
	X-Y-Pro-Leu-X-Y	0,2—20	1	2	5	—	—	—
	X-Y-Val-Gly-X-Y	—	—	—	—	—	—	—
	X-Y-Val-Pro-X-Y	—	—	—	—	—	—	—
	X-Y-Gly-Gly-Gly-X-Y	5,0—100	10	15	20	50	—	—
25	X-Y-Gly-Ala-Ala-X-Y	0,1—20	0,2	1	2	—	—	—
	X-Y-Gly-Asp-Ser-X-Y	0,01—400	—	—	2	—	—	—
	X-Y-Gly-His-Lys-X-Y	0,001—360	—	2	5	100	2	360
	X-Y-Gly-Pro-Ala-X-Y	0,1—50	0,2	1	2	—	—	—
	X-Y-Gly-Ser-Ala-X-Y	0,1—50	0,3	1	2	—	—	—
30	X-Y-Gly-Gly-Ala-X-Y	0,1—50	—	1	2	—	—	—
	X-Y-Ala-Ala-Gly-X-Y	0,1—50	—	—	—	—	—	—
	Tripeptidfraktion		2	—	—	—	—	—

35 Die Buchstaben X, Y stehen für Aminosäuren beliebiger Art und Menge von jeweils 0 bis maximal 50.
 Die Peptide in den Tabellen 6 bis 8 können als natürliche isolierte Peptide oder/und als synthetisch hergestellte Peptide eingesetzt werden.

40

45

50

55

60

65

Tabelle 7

Beispiele 31 bis 36 (jeweils mg/L Präparat)

Peptide	Bereich	BP-1	BP-2	BP-3	BP-4	BP-5	BP-6	5
X-Y-Ala-Ala-X-Y	0,1–20	1	3	3	10	—	—	10
X-Y-Ala-Gly-X-Y	0,1–30	2	12	20	—	—	—	
X-Y-Ala-Pro-X-Y	0,1–20	—	0,1	—	—	—	—	
X-Y-Arg-Gly-X-Y	0,1–30	0,25	1	2	—	—	—	
X-Y-Gly-Ala-X-Y	0,1–20	4	7	10	—	—	—	
X-Y-Gly-Glu-X-Y	0,1–25	2	4	10	—	—	—	15
X-Y-Gly-Gly-X-Y	1,0–200	75	26	30	100	—	200	
X-Y-Gly-Ser-X-Y	1,0–50	1	2	5	—	—	—	
X-Y-Gly-Leu-X-Y	1,0–100	5	10	20	75	—	75	
X-Y-Gly-Pro-X-Y	0,1–20	1	2	5	—	—	—	
X-Y-Gly-Thr-X-Y	0,1–20	1	2	5	—	—	—	20
X-Y-Gly-Val-X-Y	0,2–50	2	5	5	—	—	—	
X-Y-Pro-Gly-X-Y	0,2–30	1,5	3	3	—	—	—	
X-Y-Pro-Leu-X-Y	0,1–20	1	2	5	—	—	—	
X-Y-Val-Gly-X-Y	0,1–2	—	0,2	—	—	—	—	
X-Y-Val-Pro-X-Y	0,1–2	—	0,3	—	—	—	—	25
X-Y-Gly-Gly-Gly-X-Y	2,0–100	10	15	20	50	—	—	
X-Y-Gly-Ala-Ala-X-Y	0,1–20	0,2	1	2	—	—	—	
X-Y-Gly-Asp-Ser-X-Y	0,01–400	—	—	2	—	—	—	
X-Y-Gly-His-Lys-X-Y	0,001–360	—	2	5	100	2	360	
X-Y-Gly-Pro-Ala-X-Y	0,1–50	0,2	1	2	—	—	—	30
X-Y-Gly-Ser-Ala-X-Y	0,1–50	0,3	1	2	—	—	—	
X-Y-Gly-Gly-Ala-X-Y	0,1–50	—	1	2	—	—	—	
X-Y-Ala-Ala-Gly-X-Y	0,1–50	—	1	2	—	—	—	
Tripeptidfraktion	—	—	2	—	—	—	—	
Hauptpartialhydrolysat	1,0–500	—	500	—	—	—	—	35

Tabelle 8

Beispiele 37 bis 42 (jeweils mg/L Präparat)

Peptide	Bereich	EP-1	EP-2	EP-3	EP-4	EP-5	EP-6	40
X-Y-Ala-Pro-X-Y	1–40	3	10	15	40	—	—	45
X-Y-Gly-Gly-X-Y	10–300	5	40	200	200	200	400	
X-Y-Gly-Val-X-Y	5–340	4	25	25	—	25	—	
X-Y-Val-Gly-X-Y	2–20	2	10	10	—	10	—	
X-Y-Val-Pro-X-Y	1–30	3	3	3	—	—	—	

Tabelle 9

Beispiele 43 bis 48 (jeweils mg/L Präparat)

Spurenelemente	Bereich	CTS-1	CTS-2	CTS-3	CTS-4	CTS-5	CTS-6	55
Eisen-(II)-lactat	0,1–50 mg	—	—	—	—	—	—	60
Magnesiumsulfat	1,0–2000 mg	—	50,0	1600	1600	1600	1600	
Natriummolybdat	0,1–1 mg	—	0,5	0,8	0,8	0,8	1,0	
Mangansulfat	1,0–10 mg	—	0,5	0,8	0,8	0,8	1,0	
Zinksulfat	0,1–10 mg	—	—	—	—	—	—	
Cobaltsulfat	0,01–0,5 mg	—	0,05	0,08	0,08	0,08	0,1	65

Tabelle 10

Beispiele 49 bis 54 (jeweils mg/L Präparat)

5	Spurenelemente	Bereich	BTS-1	BTS-2	BTS-3	BTS-4	BTS-5	BTS-6
	Eisen-(II)-lactat	0,1–50 mg	10,0	20,0	50,0	20,0	20,0	20,0
	Magnesiumsulfat	1,0–2000 mg	50,0	50,0	2000	2000	2000	2000
10	Natriummolybdat	0,1–1 mg	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	Mangansulfat	1,0–10 mg	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	Zinksulfat	0,1–10 mg	0,2	0,2	—	1,0	1,0	1,0
	Cobaltsulfat	0,02–0,5 mg	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Tabelle 11

Beispiele 55 bis 60 (jeweils g/L Präparat)

20	Antioxidantien, Radikalfänger und Hilfsstoffe	Bereich	CAH-1	CAH-2	CAH-3	CAH-4	CAH-5	CAH-5
	Natriumascorbat	0,5–30 g	1,0	1,0	0,8	—	—	—
25	Mannit	10,0–30 g	20,0	20,0	15,0	—	—	—
	Sorbit	10,0–500 g	—	—	15,0	100,0	50,0	—
	Glycerin	10,0–900 g	50,0	50,0	80,0	100,0	100,0	900,0
	Natriumlactatlösung	10,0–500 g	20,0	20,0	15,0	—	—	—
	Citronensäure	1,0–100 g	—	20,0	15,0	1,0	1,0	—
30	Ethanol	1,0–300 g	—	16,0	12,0	—	—	—
	Panthenol	10,0–500 g	—	—	105,0	110,0	200,0	—
	Sojapeptide	0,1–300 g	1,0	1,0	1,5	1,4	1,4	1,4
	Hydroxybenzoesäure- methylester-Natriumsalz	1,0–2 g	1,0	2,0	1,0	1,0	1,0	1,0
35	Phenonip	2,0–4 g	2,0	—	2,0	2,0	2,0	2,0

Tabelle 12

Beispiele 61 bis 66 (jeweils g/L Präparat)

40	Antioxidantien, Radikalfänger und Hilfsstoffe	Bereich	BAH-1	BAH-2	BAH-3	BAH-4	BAH-5	BAH-5
45	Natriumascorbat	0,5–30 g	1,0	3,0	—	2,0	—	—
	Mannit	10,0–30 g	20,0	25,0	—	—	—	—
	Sorbit	10,0–500 g	10,0	100,0	50,0	50,0	50,0	—
	Glycerin	10,0–900 g	50,0	50,0	50,0	50,0	100,0	200,0
50	Natriumlactatlösung	10,0–500 g	15,0	20,0	20,0	20,0	20,0	—
	Citronensäure	1,0–100 g	10,0	10,0	10,0	2,0	2,0	2,0
	Ethanol	1,0–300 g	12,0	10,0	10,0	—	—	—
	Panthenol	10,0–500 g	—	100,0	200,0	300,0	200,0	500,0
	Sojapeptide	0,1–50 g	1,0	1,0	1,5	1,4	1,4	1,4
55	Hydroxybenzoesäure- methylester-Natriumsalz	1,0–2 g	2,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	Phenonip	2,0–4 g	—	—	2,0	2,0	2,0	2,0

Tabelle 13

Beispiele 66 bis 72 (jeweils g/L Präparat)

Weitere Inhaltsstoffe	Bereich	CMS-1	CMS-2	CMS-3	CMS-4	CMS-5	CMS-6	5
Saccharide:								
Glucose	1,0–200 g	—	20,0	15,0	50,0	100,0	150,0	
Galaktose	1,0–30 g	5,0	—	—	20,0	—	—	10
Mannose	—	—	—	—	—	—	—	

Tabelle 14

Beispiele 73 bis 78 (jeweils µg, mg oder g/L Präparat)

Weitere Inhaltsstoffe	Bereich	BMS-1	BMS-2	BMS-3	BMS-4	BMS-5	BMS-6	15
Saccharide:								
Glucose	1,0–200 g	5,0	50,0	—	100,0	50,0	—	
Galaktose	0,5–50 g	0,5	2,0	—	10,0	—	20,0	20
Mannose	0,5–50 g	0,5	2,0	20,0	20,0	—	—	
Nukleotide/Nukleoside:								25
Adenin	5,0–50 mg	15,0	—	30,0	25,0	20,0	—	
Adenosin	5,0–40 mg	18,0	20,0	30,0	—	20,0	40,0	
Cytidin	5,0–30 mg	20,0	—	25,0	30,0	25,0	—	
Cytosin	5,0–30 mg	20,0	—	25,0	—	25,0	—	30
Guanin	3,0–25 mg	15,0	—	25,0	20,0	—	—	
Guanosin	3,0–25 mg	18,0	—	25,0	—	25,0	—	
Thymin	5,0–50 mg	20,0	—	40,0	40,0	35,0	50,0	
Thymidin	5,0–50 mg	20,0	—	50,0	—	30,0	—	
Inosin	10,0–100 mg	50,0	100,0	60,0	70,0	50,0	100,0	35
Proteine/Mucopolysaccharide:								
Hyaluronsäure	1,0–50 g	—	1,0	3,0	—	—	—	
Chondroitinsulfat	1,0–50 g	—	1,0	10,0	10,0	5,0	—	
Laminin	1,0–50 µg	—	1,0	3,0	3,0	3,0	5,0	
Entactin	1,0–50 µg	—	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	40
Fibrillin	1,0–50 µg	—	1,0	1,0	1,0	5,0	5,0	
Vitronectin	1,0–50 µg	—	1,0	10,0	10,0	20,0	25,0	
Fibronectin	1,0–100 µg	—	1,0	100,0	100,0	300,0	300,0	
Nidogen	1,0–50 µg	—	1,0	2,0	2,0	5,0	5,0	
Tanescin	1,0–50 µg	—	1,0	2,0	2,0	3,0	3,0	45
Filagrin	1,0–50 µg	—	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0	

Herstellung von Präparat A

1 kg denaturiertes Kollagen (Gelatine) wird in 9 kg 1n-HCl-Lösung suspendiert und angelöst. Die Lösung wird in einem dicht verschlossenen Gefäß unter Rühren schnell auf 100°C erwärmt, die Temperatur 3 Stunden konstant gehalten, anschließend schnell wieder auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 6n-NaOH-Lösung neutralisiert. Das Präparat wird mit Hilfe der Gelchromatographie bzw. anderer geeigneter Methoden entsalzt und/oder mit dest. Wasser auf ein Volumen von 20 l aufgefüllt, mit 0,2% Konservierungsmittel (zum Beispiel Phenonip oder Hydroxybenzoesäureester) konserviert und sterilfiltriert. Fig. 1 gibt eine Übersicht über die Aminosäuren und Peptide im Präparat A. Fig. 1 ist das Ergebnis einer zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie. Als Vergleich dient Fig. 2 mit einem Standard-Aminosäurengemisch, das unter den gleichen Bedingungen chromatographisch getrennt wurde. Fig. 1A dagegen zeigt die Aminosäuren und Peptide nach unzureichender partieller Hydrolyse.

Die biologische Wirksamkeit des Präparates A wurde durch Bestimmung der Stoffwechselaktivierung an Rattenleber-Mitochondrien geprüft. Das Präparat A verursachte eine 60%ige Stoffwechselsteigerung im Vergleich zur Kontrolle.

Zur Stabilisierung der Peptide enthielt das Präparat A die Rezepturfraction CAH-1 (Tabelle 11, Beispiel 55).

Herstellung von Präparat B

Das Präparat B enthält die Rezepturfractionen CAS-1, CTS-2, CAH-2, CMS-2 und CP-1.

0,6 kg destilliertes Wasser vorlegen und die leichtlöslichen Aminosäuren zuerst lösen. Die schwerlöslichen Aminosäuren (Asparaginsäure, Glutaminsäure, Leucin, Phenylalanin, Tyrosin, Valin) werden in 2n-NaOH-Lösung vorgelöst. Nach Zugabe von Citronensäure wird der pH-Wert der Lösung mit 10n-NaOH im Bereich von 5 bis 9 gehalten und wird nach vollständigem Lösen der Citronensäure auf 6,5 eingestellt. Danach erfolgt Zugabe von Mannit, Glucose, Ascorbat, Natriumlactat, Ethanol, Glycerin, Sojapeptiden, Dipeptiden, Tripeptiden, Tripeptidfraktion, Spurenelementen und Hydroxybenzoesäuremethylester-Natriumsalz. Der pH-Wert wird mit 6n-HCl auf 6,5 eingestellt. Der Ansatz wird mit dest. Wasser auf 1 l Gesamtansatzmenge aufgefüllt und unter sterilen Bedingungen sterilfiltriert.

Isolierung der Tripeptidfraktion A und der Tripeptidfraktion B

Das oben beschriebene Präparat A wird vorzugsweise mit hochauflösender Säulenchromatographie, zum Beispiel mit Kieselgel 60 als Sorptionsmittel und mit Elutionslösungen, vorzugsweise Butanol/Essigsäure/Wasser 4 : 1 : 1, und Propanol/Ammoniak (25%) 7 : 3, in mindestens zwei Elutionsstufen aufgetrennt, um ein Tripeptid zu isolieren, das sich wie folgt analytisch charakterisieren läßt:

Nach saurer Hydrolyse, 24 Stunden in 6n-HCl bei 105°C, werden drei Aminosäuren freigesetzt, die nach eindimensionaler Dünnschichtchromatographie folgende hRf-Werte haben: hRf-Werte 34, 42, 11 für die Aminosäuren 1 bis 3 im Fließmittel 96% Ethanol/34% Ammoniak im Verhältnis 7 : 3 und die hRf-Werte 32, 20 und 2 für die Aminosäuren 1 bis 3 im Fließmittel 1-Propanol/Wasser im Verhältnis 7 : 3. Nach der Sequenzanalyse entspricht die Numerierung der Aminosäuren 1 bis 3 ihren Positionen im Tripeptid, beginnend mit der aminoterminalen Aminosäure. Damit ist die Tripeptidfraktion A als das Tripeptid Gly-His-Lys identifiziert.

Die entsprechenden Schritte werden eingehalten, um die Peptidfraktion B mit dem Tripeptid Gly-Asp-Ser zu identifizieren. Anstelle der isolierten Tripeptide können auch die entsprechenden, nach gängigen Verfahren synthetisierten und gereinigten Tripeptide verwendet werden.

Herstellung von Peptid-Spurenelement-Komplexen

Ein weiterer Verfahrensschritt bei der Herstellung der Peptidfraktion besteht in der Komplexierung entweder des isolierten oder des synthetisierten Tripeptids mit Kupfer; 0,01 mol/L Tripeptid mit 0,01 mol/L Kupfer(II)-acetat-Monohydrat gemischt und mit 0,1n-NaOH-Lösung neutralisiert. Die Tripeptidfraktion wird in kleinen Portionen kühl gelagert.

Wirkungsnachweise für das Präparat A, Präparat B und die Tripeptide

Die biologische Wirksamkeit des Tripeptids wurde u. a. an menschlichen Hautfibroblasten im Zellkulturversuch bestimmt (Fig. 3). Nach Zugabe von 10–8 bis 10–11 mol/l Tripeptid zum Zellkultur-Nährmedium wurde die Kollagenproduktion der menschlichen Hautfibroblasten um 50 bis 250% im Vergleich zur Kontrolle gesteigert.

Das Präparat B zeigte in einer anderen biochemischen Untersuchung eine Stoffwechselsteigerung bei Leber-Mitochondrien um 80% im Vergleich zur Kontrolle.

Ein leicht variiertes Präparat B, das die Rezepturfractionen CAS-3, CP-5, CTS-3, CAH-3 und CMS-2 enthält, verursacht eine Stoffwechselsteigerung von 80% bei Leber-Mitochondrien und besitzt außerdem die Fähigkeit, Hydroxylradikale bis zu 40% zu inaktivieren (Fig. 6).

In diesem spezifischen quantitativen Radikalfängertest werden durch Einwirkung des Enzyms Xanthinoxidase auf das Substrat Xanthin in einer Kettenreaktion hochreaktive Hydroxylradikale freigesetzt. Die viskose Hyaluronsäure in der wäßrigen Untersuchungslösung wird durch die Hydroxylradikale innerhalb von 40 Minuten zersetzt, meßbar durch den schnellen, starken Viskositätsabfall. Der gemessene Wert der Viskositätsabnahme hängt ab von der Gesamtmenge der Hydroxylradikale und der Quantität und Qualität eventuell anwesender Hydroxyl-Radikalfänger, die den Viskositätsabfall deutlich hemmen.

Herstellung von Präparat C

Das Präparat C enthält die Rezepturfractionen AS-1, BP-2, BAH-1, BMS-1 und BTS-1.

0,6 kg destilliertes Wasser werden vorgelegt und die leichtlöslichen Aminosäuren eingerührt. Die schwerlöslichen Aminosäuren werden in 2n-NaOH vorgelöst. Guanin wird in 3n-HCl unter Erwärmen auf ca. 60°C gelöst. Die vorgelösten Aminosäuren werden in den Ansatz eingerührt. Nach Zugabe von Citronensäure wird der pH-Wert der Lösung mit 10n-NaOH reguliert, so daß der pH-Wert von 5 nicht unterschritten und 9 nicht überschritten wird. Nach vollständigem Lösen der Citronensäure wird die Guanin-HCl-Lösung eingerührt und der pH-Wert auf 6,5 eingestellt. Danach erfolgt Zugabe von Mannit, Sorbit, Natriumlactat, Glycerin, Ethanol, Natriumascorbat, Sacchariden, Peptiden, Nukleotiden, Tripeptidfraktion, Hautpartialhydrolysat (bezogen auf das Trockengewicht), Spurenelementen und Hydroxybenzoesäuremethylester-Natriumsalz. Der pH-Wert wird mit 6n-HCl auf 6,5 eingestellt, der Ansatz mit dest. Wasser auf 1 l Gesamtvolumen aufgefüllt und unter sterilen Bedingungen sterilfiltriert.

Die Tripeptidfraktion entspricht der obigen Beschreibung (siehe Herstellung der Tripeptidfraktionen A und B).

Herstellung des Hautpartialhydrolysats

Gewaschene und von Unterhautfettgewebe befreite Kalbshaut wird zerkleinert. 3 kg zerkleinertes Gewebe (Feuchtgewicht) wird in 7 kg 1,5n-HCl suspendiert, angelöst und in einem dicht verschlossenen Gefäß unter Rühren schnell auf 100°C erwärmt. Nach 3 Stunden bei 100°C wird schnell wieder auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 10n-NaOH-Lösung neutralisiert. Nach mehrstufiger Filtration über Tiefenschichtenfilter wird der geklärte Extrakt mit 0,2% Hydroxybenzoesäuremethylester-Natriumsalz konserviert, der pH-Wert der Lösung auf 6,5 eingestellt und die Lösung unter sterilen Bedingungen sterilfiltriert. Nach Bestimmung des Trockengewichtes wird ein entsprechendes Volumen des Hautpartialhydrolysats – bezogen auf das Trockengewicht – in das Präparat eingebracht.

Die biologische Wirksamkeit des halbsynthetischen Bindegewebsextraktes wurde an Rattenleber-Mitochondrien geprüft. Es wurde eine Steigerung der Stoffwechselaktivität um 80% gemessen.

Applikationsbeispiele 1 und 2

Biotechnologie und Medizin

Applikationsbeispiel 1

Biotechnologie

Zur Stimulierung des Zellwachstums oder der Synthese von Stoffwechselprodukten wird serumarmen oder -freien Zellkulturmedien ca. 1 bis 5% der in dieser Erfindung beschriebenen Präparate zugesetzt. Die Zellkulturnährlösung für Hautfibroblasten hat folgende Zusammensetzung:

94% Dulbecco's Minimal Essential Medium, incl. 2 mmol/l Glutamin,
5% fötales Kälberserum.

Applikationsbeispiel 2

Medizin

Zur Förderung der Wundheilung werden ca. 2 bis 5% der beschriebenen Präparate oder mindestens 50 bis 200 mg Gly-His-Lys/kg in medizinische Salben, Cremes, Lotionen, Tinkturen, Wundheilungssprays eingearbeitet oder Wundabdeckungen damit imprägniert.

Applikationsbeispiele 3 bis 5

Kosmetik

Mindestens drei Wirkeigenschaften der in dieser Erfindung beschriebenen Präparate weisen auf eine erfolgreiche Anwendung bei der Pflege der Haut: Die Steigerung der Stoffwechselaktivität, die Radikalfängerwirkung und die Stimulierung der Kollagensynthese von Fibroblasten.

Die kosmetischen Präparate zur Pflege der Haut: Feuchtigkeits- und Tagescremes für trockene Haut, Nachtcremes, Sonnenschutzpräparate, After-Sun-Lotionen, Anti-Falten-Cremes, Hautschutzcremes und After-Shave-Lotionen sollten eine Mindestkonzentration von 2 bis 5% der in dieser Erfindung beschriebenen Präparate enthalten.

Applikationsbeispiel 3

Feuchtigkeitscreme

5	A. Paraffin flüssig	1,5%
	Lanette 0	3,0%
	Isopropylmyristat	4,0%
	Abil AV 200	1,0%
	Arlacel 165	6,5%
10	Emulgator G-1790	3,8%
	Propyl-4-hydroxybenzoat	0,05%
	Oxyhex 2004	0,02%
	B. Allantoin	0,3%
15	Karion F flüssig	6,0%
	Methyl-4-hydroxybenzoat	0,2%
	Wasser dem.	65,43%
	C. Kollagen	5,0%
20	Präparat B	3,0%
	D. Parfumöl	0,3%

Herstellung

25 Phase A bei 80°C schmelzen und Phase B auf 80°C erwärmen. B unter Rühren A zusetzen. Bei 30°C die Phasen C und D einrühren.

Applikationsbeispiel 4

Tagescreme für trockene Haut

30	A. Tegomuls 90 S	6,25%
	Sonnenblumenöl	5,0%
	Erdnußöl	5,0%
	Weizenkeimöl	5,0%
35	Sheabutter	5,0%
	Phenonip	0,3%
	B. Wasser, dem.	66,85%
	D-Panthenol 50%ig	1,0%
40	Aloe vera	2,0%
	Phenonip	0,3%
	C. Präparat C	3,0%
	D. Parfumöl	0,3%

Herstellung

45 Phase A bei 75°C schmelzen und Phase B auf 75°C erwärmen. B in A einrühren. C bei 45°C und D bei 35°C einrühren.

50

55

60

65

Applikationsbeispiel 5

Sonnenschutzcreme

A. Arlacel 481	8,0%	5
Cremophor WO 7	2,0%	
Elfacos ST 9	2,0%	
Iso-Adipat	12,0%	
Permulgin 3220	2,0%	10
Vaseline weiß	5,0%	
Magnesiumstearat	0,5%	
Aluminiumstearat	0,5%	
Isopropylmyristat	10,0%	
Uvinult 150	3,0%	15
B. 1,2-Propylenglykol	5,0%	
Magnesiumsulfat-7-Hydrat	0,7%	
Phenonip	0,25%	
Wasser	45,75%	20
C. Präparat B	3,0%	
D. Parfumöl	0,3%	

Herstellung

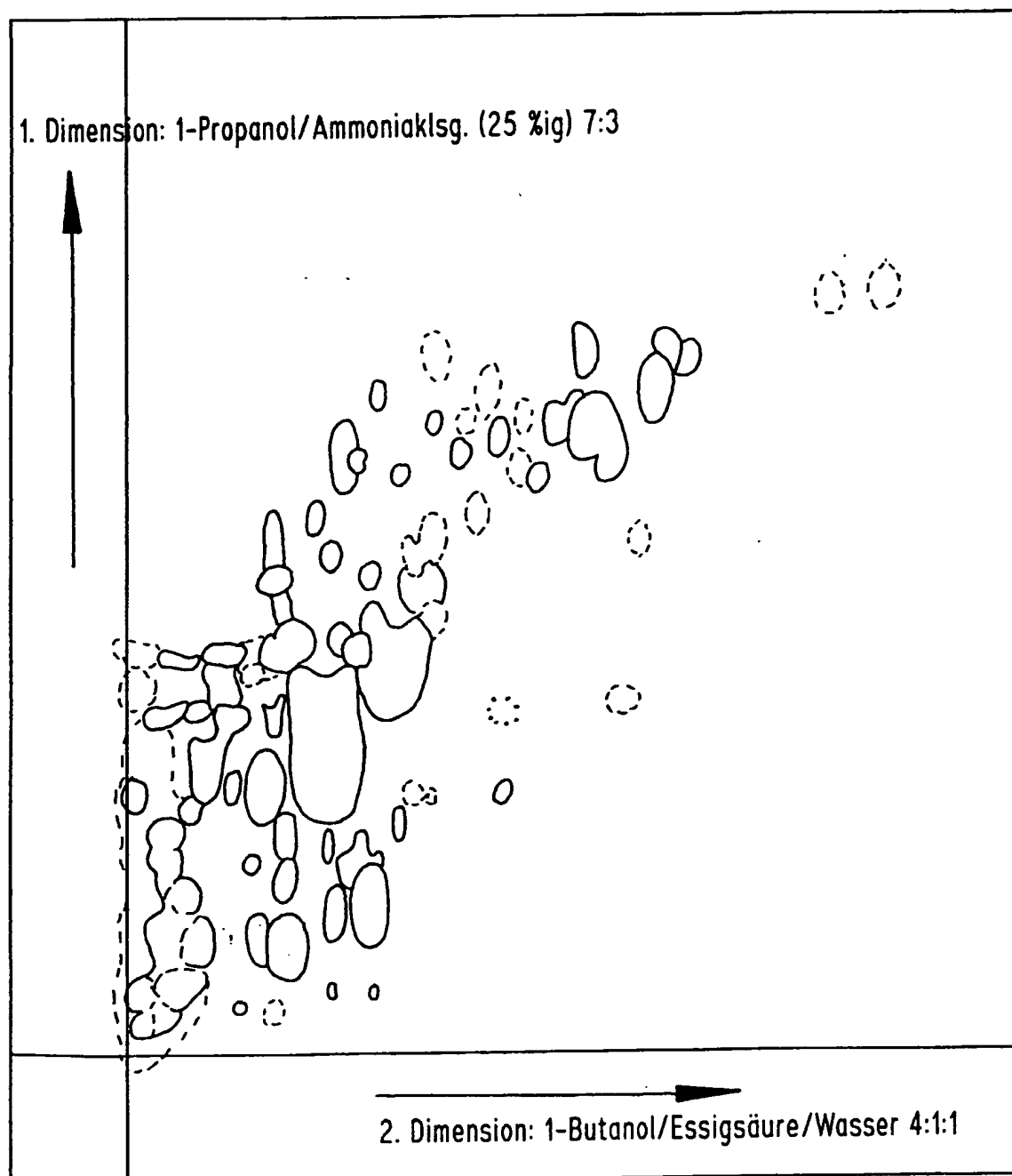
Phase A und Phase B getrennt auf 75°C erwärmen und B in Phase A langsam einrühren, homogenisieren und kaltrühren. C bei 45°C und D bei 35°C einrühren. 25

Patentansprüche

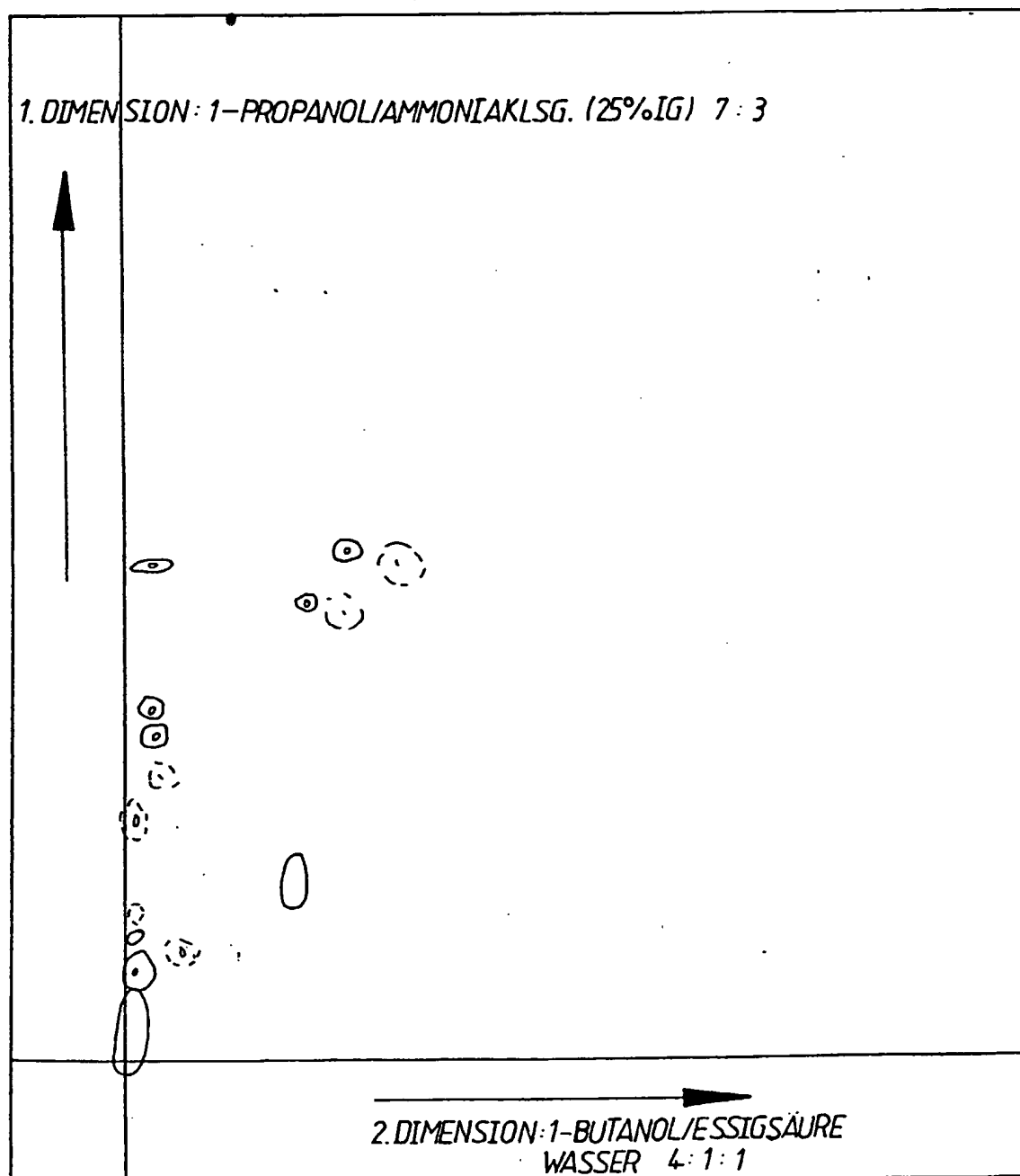
1. Präparat für kosmetische, pharmazeutische und biotechnologische Anwendungen, **dadurch gekennzeichnet**, daß es die Aminosäuresequenz Gly-His-Lys und/oder Gly-Asp-Ser als Tripeptid und/oder Teilabschnitt von Peptiden in einer Konzentration von 10^{-12} bis 10^{-2} mol/L enthält. 30
2. Präparat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es nach milder Hydrolyse von Kollagen, Gelatine, hydrolysierten Gelatine, Elastin, Keratin und Bindegewebe in 0,5- bis 6,0n-HCl 0,1 Stunden bis 7 Tage bei Temperaturen zwischen 20°C und 121°C, Peptide und Aminosäuren in einer Konzentration von 10^{-12} bis 1 mol/L enthält. 35
3. Präparat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es Peptide in einer Konzentration von 10^{-12} bis 10^{-2} mol/L enthält, die als Partialhydrolysat durch enzymatische Behandlung mit Kollagenase als Clostridium histolyticum gewonnen werden. 35
4. Präparat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Präparat Mineralstoffe und Spurenelemente in einer Konzentration von jeweils 10^{-7} bis 10^{-1} mol/L enthält, vorzugsweise Mg, Mn, Cu, Co, Fe, Se, Mo und/oder Zn und/oder vorzugsweise in Form von Komplexen mit den Peptiden. 40
5. Präparat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es zur Wirkungssteigerung vorzugsweise folgende Inhaltsstoffe der Haut und der Bindegewebe in ihrer natürlichen oder hydrolysierten Form in einer Konzentration von 10^{-12} bis 2 mol/L enthält: Saccharide, Polysaccharide, Mucopolysaccharide, Laminin, Entactin, Fibrillin, Vitronectin, Fibronectin, Nidogen, Tanescin, Filagrin, Cytokine, Chalone, zellwachstumsstimulierende, zellwachstumshemmende Substanzen, Immunmodulatoren der Haut, Lipide, Phospholipide, Ceramide, Glycosphingolipide, DNA, RNA, Nukleotide, Nukleoside, Aminosäuren und/oder Enzyme der Haut. 45
6. Präparat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es zur Reduzierung der Adsorption wirksamer Peptide an den Innenflächen der Glasgefäße oder Kunststoffgefäße 0,01% bis 30% einer Peptidmischung enthält, vorzugsweise 0,5% Sojapeptide. 50
7. Präparat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es zur Reduzierung der Hydrolyse und der Inaktivierung der Peptide jeweils 1% bis 90% wasserlösliche Antioxidantien, Radikalfänger und/oder Radikalquencher enthält, vorzugsweise Ascorbinsäure, Glycerin, Mannit und/oder Sorbit. 55
8. Präparat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß für die Anwendung die Konzentration der isolierten Peptide oder der Peptide in den Partialhydrolysaten 10^{-12} bis 10^{-1} mol/L beträgt, vorzugsweise 10^{-7} mol/L für die kosmetische Anwendung und 10^{-3} mol/L für die pharmazeutische Anwendung, bezogen auf die Konzentration der Peptide in den kosmetischen, pharmazeutischen und biotechnologischen Endprodukten. 60
9. Präparat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Wirkungsspektrum des Präparats im Vergleich zu den nicht hydrolysierten Ausgangsmaterialien erweitert ist, vorzugsweise in bezug auf Zellatmungssteigerung, Stimulierung der Kollagensynthese und/oder Radikalfänger-Wirkung. 65

Hierzu 7 Seite(n) Zeichnungen

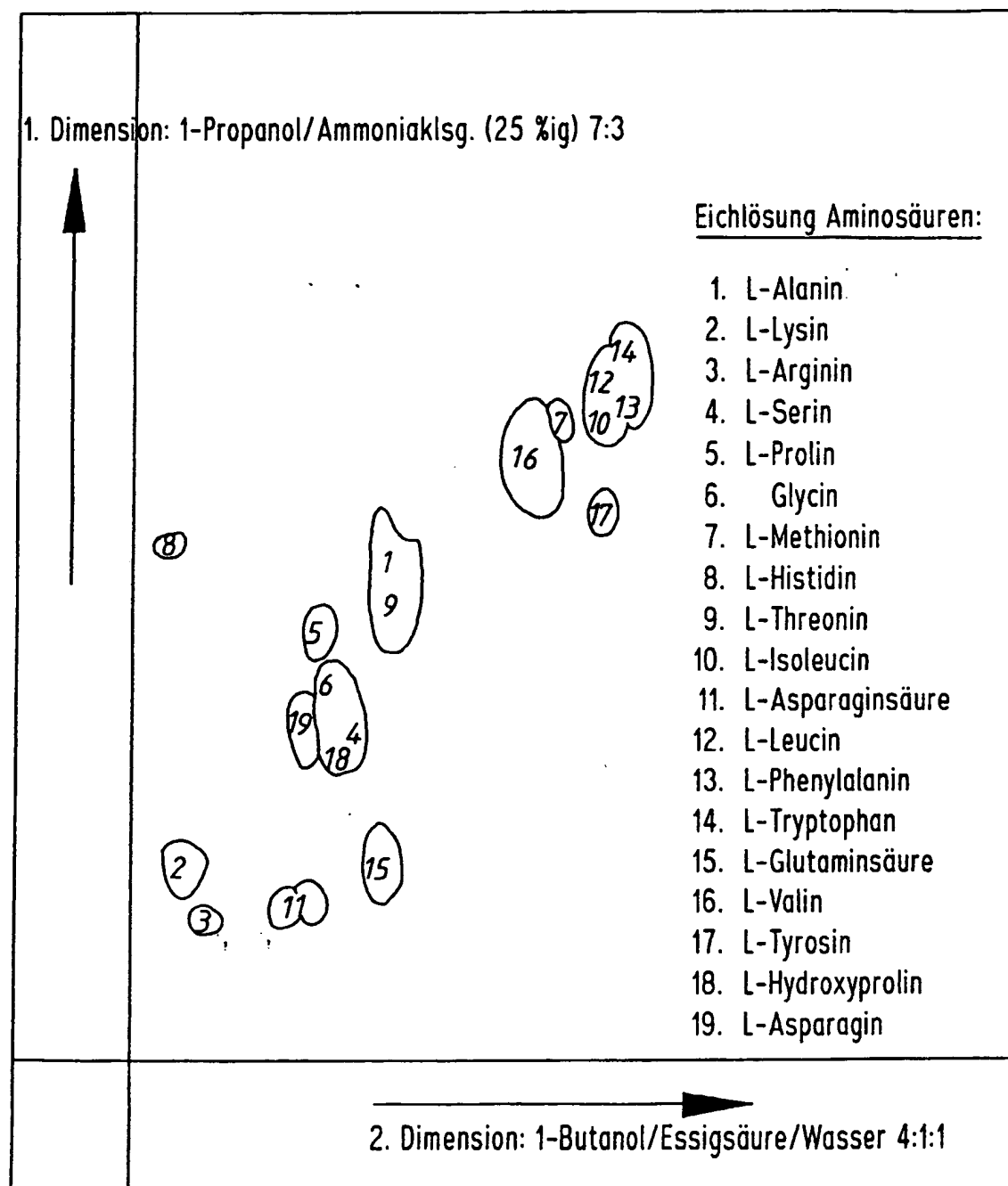
Figur 1: 2-dimensionale Dünnschichtchromatographie
von partialhydrolysierte Gelatine



FIGUR 1A: 2-DIMENSIONALE DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE
VON PARTIALHYDROLYSIERTER GELATINE

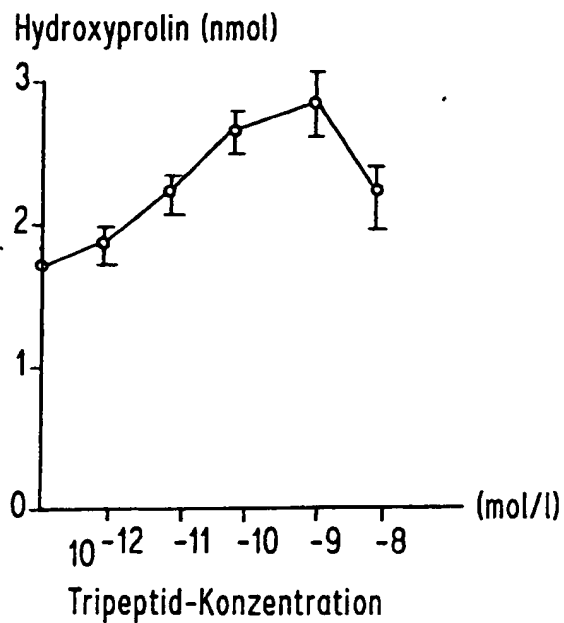


Figur 2: Standard-Aminosäurengemisch nach 2-dim. Dünnschichtchromatographie, ähnlich wie ein Kollagen-Totalhydrolysat

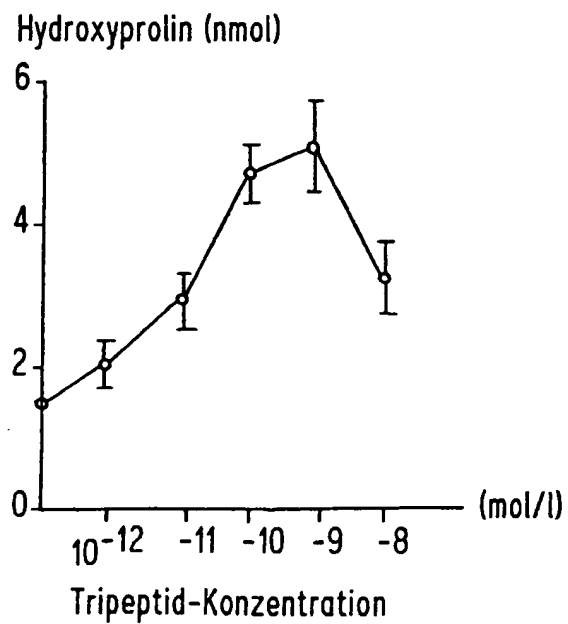


Figur 3: Wirkung des isolierten Tripeptids auf die Kollagensynthese von Fibroblasten der menschlichen Haut.

Figur 3.1.



Figur 3.2.



Figur 4: Aminosäureteilsequenz (Position 1-360) von Kollagen Typ I, α -1

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

(extra-helical peptide, N-terminal): (GLU-

leu-ser -tyr -gly-tyr -ASP-GLU-LYS-ser-thr-gly -ile -ser-val -pro-)

gly-pro -met -gly-pro -ser -gly-pro -ARG-gly-leu -hyp -gly-pro -hyp-

15 gly-ala -hyp -gly-pro -gln -gly-phe -gln -gly-pro -hyp -gly-GLU -hyp-

30 gly-GLU -hyp -gly-ala -ser -gly-pro -met-gly-pro -ARG-gly-pro -hyp-

45 gly-pro -hyp -gly-LYS -asn -gly-ASP-ASP-gly-GLU -ala -gly-LYS -pro-

60 gly-ARG-hyp -gly-GLU -ARG-gly-pro -hyp-gly-pro -gln -gly-ala -ARG-

75 gly-leu -hyp -gly-thr -ala -gly-leu -hyp-gly-met -HYL -gly-HIS-ARG-

90 gly-phe -ser -gly-leu -ASP-gly-ala -LYS-gly-ASP -ala -gly-pro -ala-

105 gly-pro -LYS -gly-GLU -hyp -gly-ser -hyp-gly-GLU -asn -gly-ala -hyp-

120 gly-gln -met -gly-pro -ARG-gly-leu -hyp-gly-GLU -ARG-gly-ARG-hyp-

135 gly-ala -hyp -gly-pro -ala -gly-ala -ARG-gly-asn -ASP-gly -ala -ala-

150 gly-ala -ala -gly-pro -hys -gly-pro -thr -gly-pro -thr -gly-pro -hyp-

165 gly-phe -hyp -gly-ala -val -gly-ala -LYS-gly-GLU -ala -gly-pro -GLU-

180 gly-ala -ARG-gly-ser -GLU-gly-pro -gln -gly-val -ARG-gly-GLU -hyp-

195 gly-pro -hyp -gly-pro -ala -gly-ala -ala -gly-pro -ala -gly-asn -hyp-

210 gly-ala -ASP-gly-gln -hyp -gly-ala -LYS-gly-ala -asn -gly-ala -hyp-

225 gly-ile -ala -gly-ala -hyp -gly-phe -hyp-gly-ala -ARG-gly-pro -ser-

240 gly-pro -GLU -gly-pro -ser -gly-ala -hyp-gly-pro -LYS -gly-asn -ser-

255 gly-GLU -hyp -gly-ala -hyp -gly-asn -LYS-gly-ASP-thr -gly-ala -LYS-

270 gly-GLU -hyp -gly-pro -ala -gly-val -gln -gly-pro -hyp -gly-pro -ala-

285 gly-GLU-GLU -gly-LYS-ARG-gly-ala -ARG-gly-GLU -hyp -gly-pro -ser-

300 gly-leu -hyp -gly-pro -hyp -gly-GLU-ARG-gly-gly -hyp -gly-ser-ARG-

315 gly-phe -hyp -gly-ala -ASP-gly-val -ala -gly-pro -LYS-gly-pro -ala-

330 gly-GLU -ARG-gly-ser -hyp -gly-pro -ala -gly-pro -LYS-gly-ser -hyp-

345 gly-GLU -ala -gly-ARG-hyp -gly-GLU -ala -gly-leu -hyp -gly-ala -LYS-

Referenz: Collagen in Health and Disease, Umschlaginnenseiten

Eds, J.B.Weiss, M.I.V. Jayson, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1982

Figur 5: Aminosäureteilsequenz (Position 1-360) von Kollagen Typ I, α -2

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

(extra-helical peptide, N-terminal):

(GLU-phe-ASP-ala-LYS-gly-gly-gly-pro-)

gly-pro-met-gly-leu-met-gly-pro-ARG-gly-pro-hyp-gly-ala-ser-

15 gly-ala-hyp-gly-pro-gln-gly-phe-gln-gly-pro-hyp-gly-GLU-hyp-

30 gly-GLU-hyp-gly-gln-thr-gly-pro-ala-gly-ala-ARG-gly-pro-hyp-

45 gly-pro-hyp-gly-LYS-ala-gly-GLU-ASP-gly-HIS-hyp-gly-LYS-pro-

60 gly-ARG-hyp-gly-GLU-ARG-gly-val-pro-gly-pro-gln-gly-ala-ARG-

75 gly-phe-hyp-gly-thr-hyp-gly-leu-hyp-gly-phe-HYL-gly-ile-ARG-

90 gly-HIS-asn-gly-leu-ASP-gly-leu-thr-gly-gln-hyp-gly-ala-hyp-

105 gly-val-HYL-gly-GLU-hyp-gly-ala-hyp-gly-GLU-asn-gly-thr-hyp-

120 gly-gln-HYL-gly-ala-ARG-gly-leu-hyp-gly-GLU-ARG-gly-ARG-val-

135 gly-ala-hyp-gly-pro-ala-gly-ala-ARG-gly-ser-ASP-gly-ser-val-

150 gly-pro-val-gly-pro-ala-gly-pro-ile-gly-ser-ala-gly-pro-hyp-

165 gly-phe-hyp-gly-ala-hyp-gly-pro-HYL-gly-GLU-leu-gly-pro-val-

180 gly-asn-hyp-gly-pro-ala-gly-pro-ala-gly-pro-ARG-gly-GLU-val-

195 gly-leu-hyp-gly-leu-ser-gly-pro-val-gly-pro-hyp-gly-asn-ala-

210 gly-pro-asn-gly-leu-hyp-gly-ala-HYL-gly-ala-ala-gly-leu-hyp-

225 gly-val-ala-gly-ala-hyp-gly-leu-hyp-gly-pro-ARG-gly-ile-hyp-

240 gly-pro-val-gly-ala-ala-gly-ala-thr-gly-ala-ARG-gly-leu-val-

255 gly-GLU-hyp-gly-pro-ala-gly-ser-HYL-gly-GLU-ser-gly-asn-LYS-

270 gly-GLU-hyp-gly-ala-val-gly-gln-hyp-gly-pro-hyp-gly-pro-ser-

285 gly-GLU-GLU-gly-LYS-ARG-gly-ser-thr-gly-GLU-ile-gly-pro-ala-

300 gly-pro-hyp-gly-pro-hyp-gly-leu-ARG-gly-asn-hyp-gly-ser-ARG-

315 gly-leu-hyp-gly-ala-ASP-gly-ARG-ala-gly-val-met-gly-pro-ala-

330 gly-ser-ARG-gly-thr-ser-gly-pro-ala-gly-val-ARG-gly-pro-asn-

345 gly-ASP-ser-gly-ARG-hyp-gly-GLU-hyp-gly-leu-met-gly-pro-ARG-

Referenz: Collagen in Health and Disease, Umschlaginnenseiten

Eds, J.B.Weiss, M.I.V. Jayson, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1982